

UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de Nancy

POUR OBTENIR LE GRADE DE

Docteur ès Sciences naturelles

PAR

Jean VILLOUTREIX

Licencié ès Sciences

Chef de Travaux délégué à la Faculté de Pharmacie de Nancy

**1^{re} THÈSE : Sur les caroténoïdes d'une levure rouge :
Rhodotorula mucilaginosa (Jörg.) Harrison.**

2^e THÈSE : Proposition donnée par la Faculté.

Soutenues le 20 FEV. 1960 devant la Commission d'Examen

Président	M. E. URION.
Examineurs	MM. S. DAVID.
	J. GAYET.
Adjoint au Jury	M. F. KAYSER.

NANCY
IMPRIMERIE GRANDVILLE
40, Rue de Malzéville

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555802_0022

PREMIÈRE THÈSE

**SUR LES CAROTENOÏDES
D'UNE LEVURE ROUGE :
RHODOTORULA MUCILAGINOSA
(JÖRG.) HARRISON**

UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de Nancy

POUR OBTENIR LE GRADE DE

Docteur ès Sciences naturelles

PAR

Jean VILLOUTREIX

Licencié ès Sciences

Chef de Travaux délégué à la Faculté de Pharmacie de Nancy

**1^{re} THÈSE : Sur les caroténoïdes d'une levure rouge :
Rhodotorula mucilaginosa (Jörg.) Harrison.**

2^e THÈSE : Proposition donnée par la Faculté.

Soutenues le **20 FEV** 1960 devant la Commission d'Examen

Président	M. E. URION.
Examineurs	} MM. S. DAVID. J. GAYET.
Adjoint au Jury	
	M. F. KAYSER.

NANCY
IMPRIMERIE GRANDVILLE
10, Rue de Malzéville

1960



UNIVERSITÉ DE NANCY — FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen : M. URION.

Assesseur : M. ECHEVIN.

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE.

Professeurs honoraires : MM. GUTTON, CROZE, RAYBAUD, FALLOT, LAFFITTE, LERAY, DONZELOT, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNÉ, DE MALLEMANN, LONGCHAMON, LETORT, DODÉ, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE.

Maîtres de Conférences honoraires : MM. RAUX, LIENHART.

PROFESSEURS :

MM. CHEVALLIER	Physique.
URION	Chimie biologique.
DELSARTE	Analyse supérieure.
REMY	Zoologie.
ROUBAULT	Géologie.
VEILLET	Biologie animale.
ECHEVIN	Botanique.
WAHL	Chimie organique industrielle.
BARRIOL	Chimie théorique.
BIZETTE	Physique.
GUILLIEN	Electronique.
GIBERT	Chimie physique.
HERVÉ	Calcul différentiel et intégral.
LEGRAS	Mécanique rationnelle.
DAVID	Chimie organique.
BOLFA	Minéralogie.
NICLAUSE	Chimie.
FAIVRE	Physique appliquée.
AUBRY	Chimie minérale.
COMOLET	Mécanique physique.
DUVAL	Chimie.
COPPENS	Radiogéologie.
FRÜHLING	Physique.
LIONS	M. M. P.
SUHNER	Physique expérimentale.
HILLY	Géologie.
LE GOFF	Génie chimique.
CHAPON	Chimie biologique.
HÉROLD	Chimie minérale industrielle.
SCHWARTZ	Exploitation minière.

MAITRES DE CONFERENCES :

MM. WERNER	Botanique.
GAYET	Physiologie.
MANGENOT	Phytopathologie.
GARNIER	Agronomie.
BRUHAT	Mathématiques générales.
SADRAN	Géologie.
HADNI	Physique.
M ^{me} ROIZEN	Physique.
MM. MALAPRADE	Chimie.
RÉGNIER	Physico-Chimie.
KERN	Minéralogie.
WEPPE	Minéralogie appliquée.
LERMUSIAUX	Physique.
BERNARD	Géologie.
ARAGNOL	Mathématiques (propédeutique).
BONVALET	Mécanique appliquée.
BASTICK	Chimie.
RENARD	Physique théorique et nucléaire.
CONDÉ	Zoologie.
GOSSÉ	Génie chimique.
CHAMPIER	Physique.
GAY	Chimie biologique.

Secrétaire : M. LAPOINTE.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été entièrement effectué dans le laboratoire de M. le Professeur KAYSER, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy. Je dois beaucoup à ce Maître qui depuis huit ans ne cesse de suivre avec tant de sollicitude mon orientation scientifique. Je prie M. le Doyen KAYSER d'agréer ici mes remerciements les plus sincères et l'assurance de mes sentiments dévoués.

Mes vifs remerciements vont à M. le Doyen URION qui m'a toujours réservé un accueil bienveillant, et je lui suis reconnaissant, ainsi qu'à MM. les Professeurs DAVID et GAYET, de l'honneur qu'ils me font en acceptant de constituer le jury de ma thèse.

A tous mes Maîtres de l'Université, j'adresse mes sentiments de gratitude pour leur enseignement et leurs encouragements.

Je remercie très sincèrement Mlle Francine HASSER pour l'aide qu'elle n'a cessé de m'apporter dans l'exécution d'expériences délicates, et je n'oublie pas non plus tous mes camarades qui, par leur chaude sympathie, m'ont facilité ces recherches.

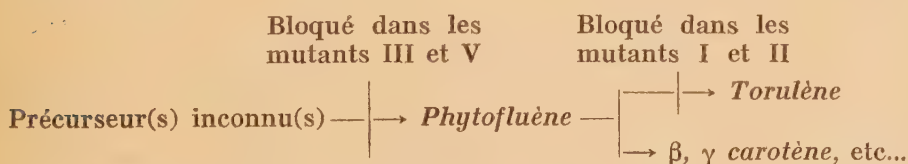
INTRODUCTION

Les caroténoïdes forment une classe parfaitement homogène de composés qui sont synthétisés *de novo* par plusieurs champignons, algues et bactéries et par toutes les plantes à chlorophylle.

Les divergences minimales de structure qui caractérisent les différents caroténoïdes naturels, laissent supposer l'existence d'un précurseur commun à partir duquel s'élaborent par filiation ou par voies indépendantes, les différents termes de cette série de pigments.

En dépit d'une masse énorme de travaux effectués, aussi bien sur les microorganismes que sur les végétaux, aucun des grands problèmes de la biosynthèse de ces composés n'a reçu de solution satisfaisante. GOODWIN (23).

Si plusieurs auteurs ont étudié la nature des caroténoïdes des levures du genre *Rhodotorula*, peu nombreux sont ceux qui parmi eux ont tenté d'utiliser ces microorganismes pour aborder le mécanisme de la biosynthèse de ces pigments. En effet, nous ne trouvons guère que le travail de BONNER et coll. (4) qui, après avoir obtenu des mutants de *Rh. rubra* par irradiation ultraviolette, ont proposé le schéma suivant que nous discuterons dans le dernier chapitre de notre travail :



Malgré leur teneur relativement faible en pigments, les levures rouges constituent, à notre avis, un matériel favorable pour l'étude de la caroténogénèse chez les organismes non photosynthétiques et nous rapportons ici les résultats que nous avons obtenus avec *Rhodotorula mucilaginosa*.

CHAPITRE PREMIER

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES CAROTENOÏDES DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

I. — MICROORGANISME EMPLOYÉ

La levure utilisée au cours de cette étude a été isolée à partir d'une levure de brasserie récoltée dans des filtres presses.

Il s'agit d'une levure rouge appartenant à l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* (*). Cette levure possède les caractéristiques suivantes :

Elle est constituée par des cellules qui, après trois jours de culture à 25° C sur moût de bière, sont ovales ou rondes, mesurant en moyenne $(3,0 - 6,8) \times (4,5 - 6,5) \mu$.

Rhodotorula mucilaginosa ne fermente pas mais assimile le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, mais pas le lactose. Elle dédouble l'arbutine mais n'assimile pas le nitrate de potassium.

(*) Le Centraal Bureau voor Schimmelcultures-Yeast Division - Delft a confirmé l'identité de cette souche avec *Rh. mucilaginosa* (Jørgensen) Harrison.

II. — MÉTHODES DE CULTURE

A) Milieux de culture

Nous avons utilisé essentiellement deux milieux de culture :

a) Un milieu entièrement synthétique :

Saccharose	20	g
SO ₄ (NH ₄) ₂	5	g
PO ₄ H ₂ K	2	g
ClNa	0,100	g
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,250	g
Cl ₂ Ca anhydre	0,250	g
Cl ₂ Mn, 4 H ₂ O	0,001	g
SO ₄ Zn, 7 H ₂ O	0,001	g
BO ₃ H ₃	0,001	g
Cl ₃ Fe	0,0005	g
SO ₄ Cu, 5 H ₂ O	0,0001	g
IK	0,0001	g
Thiamine (chlorhydrate)	0,4	mg
Riboflavine	0,2	mg
Acide nicotinique	5	mg
Acide paraaminobenzoïque	0,3	mg
Pyridoxine	1	mg
Pantothénate de calcium	0,5	mg
Mesoinositol	50	mg
Biotine	0,002	mg
Acide folique	0,002	mg
Acide L-aspartique	100	mg
Adénine	20	mg
L-histidine (monochlorhydrate)	10	mg
L-tryptophane	20	mg
DL-méthionine	20	mg
Eau distillée Q.S.p.	1.000	ml

b) *Un milieu semi-synthétique* identique au précédent mais où les facteurs de croissance ont été remplacés par un « jus de levure » obtenu selon le procédé de CONWAY et BREEN (8) : 25 g de levure de boulangerie sont dispersés dans 250 ml d'eau distillée et portés à ébullition que l'on maintient pendant une heure. La suspension est ensuite centrifugée ; le liquide surnageant constitue le « jus de levure ».

Ces milieux ont aussi été employés sous forme solide par l'addition de gélose à raison de 20 g par litre,

B) Technique de culture

Les conditions de culture ayant une influence considérable sur les caractéristiques d'une population cellulaire, il nous a paru indispensable de standardiser au maximum les conditions dans lesquelles nos cultures étaient réalisées.

Toutes nos souches sont entretenues par des repiquages mensuels sur milieu semi-synthétique gélosé. Ces souches sont maintenues aux environs de 20° sans prendre de précautions spéciales contre la lumière. En dehors de l'entretien des souches, les cultures ont été effectuées soit sur milieu liquide, soit sur milieu solide.

a) Culture sur milieu liquide :

Une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml de milieu est ensemencée à partir d'une culture sur milieu gélosé incliné. La fiole est portée dans un thermostat à 30°, l'aération est réalisée par agitation magnétique. Chaque fiole ne fournit ainsi que quelques centigrammes de levure sèche.

Pour l'obtention de plus grosses quantités de levure nous avons eu recours à l'emploi d'un incubateur (*) qui nous a permis d'opérer sur 85 litres de milieu. La stérilisation est effectuée par injection de vapeur d'eau surchauffée. L'aération est assurée par un petit compresseur débitant 3 m³ d'air par minute, le débit pouvant être réglé par une vanne placée sur l'incubateur. L'air insufflé est stérilisé par passages successifs à travers des colonnes d'huile lourde, de ponce sulfurique et finalement de coton stérile. La température est maintenue à 30° par un thermoplongeur immergé dans le milieu et contrôlée par un thermomètre à contact.

Les précultures destinées à l'ensemencement des incubateurs sont réalisées dans un ballon de 3 l contenant 2 l de milieu. L'aération est assurée par le passage d'un courant d'air stérile.

Le rendement d'un incubateur est de 250 à 300 g de levure sèche selon le milieu utilisé.

b) Culture sur milieu solide :

Nous opérons dans des boîtes de Roux de 1 l contenant chacune 200 ml de milieu gélosé stérilisé à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes. Après refroidissement, les boîtes sont ensemencées.

(*) Nous remercions bien vivement M. le Président Directeur général de la Fabrique Alsacienne de Levures et Alcools, 2, rue Schertz, Strasbourg-Meinan, qui a aimablement mis cet incubateur à notre disposition.

cées et portées à l'étuve à 30° pendant 24 heures. Elles sont ensuite abandonnées à la température du laboratoire pendant trois jours ; le rendement est pratiquement constant pour une souche donnée ; il est, pour la souche mère, d'environ 1 g de matière sèche par boîte de Roux.

III. — EXTRACTION ET SÉPARATION DES CAROTÉNOÏDES

A) Extraction

Les levures abandonnent difficilement leurs pigments aux solvants organiques, aussi PETERSON et coll. (46) proposent-ils de traiter la levure par l'acétone à froid, puis par de l'acide chlorhydrique 0,5 N au bain-marie bouillant pendant 1/4 d'heure. Après refroidissement, l'extraction est reprise avec de l'acétone. Il n'est pas douteux que dans ces conditions une partie des caroténoïdes est détruite ou isomérisée.

WITTMAN (64) préconise une déshydratation préalable de la levure par de l'acétone puis chauffage à 60° pendant 12 heures, l'extraction est alors poursuivie en atmosphère d'azote par un broyage énergétique au sein d'acétone à froid, le broyage étant réalisé à l'aide de sable de quartz dans un moulin à billes.

MODE OPÉRATOIRE :

Après lavage à l'eau distillée et centrifugation, la levure est traitée par de l'acétone à froid qui extrait, dans la plupart des cas, la presque totalité des caroténoïdes. Lorsque l'action de ce solvant est épuisée, nous achevons l'extraction par le mélange acétone-méthanol 3 : 1 qui laisse une levure blanche.

Cependant certaines cultures fournissent des levures dont les caroténoïdes ne peuvent pratiquement pas être extraits par le procédé ci-dessus. Une observation fortuite nous a montré que, si la masse humide est agitée avec du benzène pur (qui dans ces conditions n'extraît pas de pigment), le traitement ultérieur par le mélange acétone-méthanol, après élimination du benzène, permet l'extraction totale des caroténoïdes. Ce dernier procédé a cependant l'inconvénient de donner des émulsions au moment des lavages.

Quel que soit le procédé d'extraction utilisé, les solvants sont réunis, additionnés d'éther de pétrole dans lequel on fait passer

le pigment à l'aide d'une solution aqueuse à 20 % de chlorure de sodium. L'éther de pétrole, éventuellement le mélange éther de pétrole-benzène, est lavé à l'eau puis séché sur sulfate de sodium anhydre. On distille ensuite à sec en atmosphère d'azote à l'aide d'une pompe à vide à injection d'air.

Le résidu est repris par de l'éther de pétrole et la solution est placée dans un réfrigérateur pendant une nuit, ce qui précipite la majeure partie des stérols qui sont éliminés par centrifugation à 0° (la filtration a dû être proscrite car une partie du pigment reste fixée sur le filtre, même si celui-ci est en verre fritté).

B) Séparation

Elle est réalisée par chromatographie. Avant d'effectuer cette opération, il est d'usage courant, depuis les travaux de WILLSTÄTTER et STOLL (62), de diviser les caroténoïdes extraits en deux groupes, par partage entre deux solvants non miscibles comme l'éther de pétrole et le méthanol contenant 5 à 10 % d'eau. Les caroténoïdes possédant deux ou plusieurs groupes hydroxyles passent dans la couche méthanolique, ce sont les pigments dits *hypophasiques* (xanthophylles) ; les autres caroténoïdes passent dans l'éther de pétrole et sont dits *épiphasiques*.

Nous n'avons pas, au cours de nos extractions, pratiqué d'une façon systématique le partage des caroténoïdes entre éther de pétrole et méthanol aqueux. En effet, quelques essais nous ont montré que *Rhodotorula mucilaginosa* ne contient pas de xanthophylle libre, ni estérifiée, mais un pigment à caractère acide se répartissant d'une façon sensiblement égale entre la phase éthéro-pétrolique et la phase méthanolique, ce qui rend ce traitement inutile.

Différents adsorbants peuvent être envisagés pour la chromatographie.

LA CHAUX HYDRATÉE

ZECHMEISTER et TUZSON (65) ont montré que cet adsorbant n'altère pas le lycopène, le β carotène ni la cryptoxanthine. La chaux hydratée est particulièrement sélective vis-à-vis des caroténoïdes épiphasiques ; elle a été utilisée avec succès pour l'analyse des mélanges de lycopène, β carotène et xanthophylles. C'est l'adsorbant de choix pour la séparation des stéréoisomères du lycopène, du β carotène ainsi que ceux du γ carotène.

L'ALUMINE

KUHN, BROCKMANN, LEDERER (36) ont utilisé pour la séparation des α , β , γ carotènes et du lycopène, l'alumine standardisée selon BROCKMANN et dont l'emploi est actuellement très généralisé.

LA MAGNÉSIE

A la suite des travaux de STRAIN (57) la magnésie est devenue d'un usage courant. Elle se trouve sous une forme extrêmement divisée, presque colloïdale, et il est nécessaire, avant l'emploi, de l'additionner de terre de Diatomées (hyflo-supercel de la firme Johns-Manville) qui facilite la filtration.

LE SILICAGEL

Saturé par du méthanol, le silicagel a été proposé récemment par PURCELL (50) pour la séparation des caroténoïdes. D'après les résultats de cet auteur, il semble que ce procédé soit surtout utilisable pour des séparations de groupes : caroténoïdes non oxygénés, monohydroxylés, polyhydroxylés...

LA CELLULOSE

Elle conduit à un résultat sensiblement identique à celui obtenu avec le silicagel ; elle a été proposée par COSTES (9) pour l'étude des caroténoïdes d'origine foliaire.

La chromatographie sur papier n'a pas pris, en ce qui concerne les caroténoïdes, l'importance qu'elle connaît dans d'autres domaines ; GRANGAUD et GARCIA (24) ont utilisé cette technique pour l'étude des pigments de Crevettes rouges (*Aristeomorpha foliacea* et *Aristeus antennatus*).

Plus récemment, WITTMAN (64) a appliqué la technique de la chromatographie circulaire sur papier à la séparation des caroténoïdes isolés de *Rhodotorula rubra*. D'après cet auteur, la durée de la séparation des différents pigments est de l'ordre de 20 minutes. La méthode semble très séduisante mais, dans nos essais, la vitesse d'oxydation et d'isomérisation des caroténoïdes adsorbés a été telle que nous n'avons pu l'adopter.

Après plusieurs essais, nous avons préféré la chromatographie sur colonne d'alumine Merck, désactivée selon la méthode de GOODWIN (12).

C) Résultats

Nous avons pu ainsi séparer 9 zones indiquées dans le Tableau n° 1. L'éluat correspondant à chaque zone est évaporé à sec sous pression réduite, en atmosphère d'azote et après reprise du résidu par de l'éther de pétrole (Eb. 40-60°), la solution obtenue est examinée au spectrophotomètre Beckmann (modèle DU).

Zone 1 :

Le spectre u.v. laisse supposer qu'il s'agit d'esters de stérols ; le produit d'évaporation donne une réaction de Liebermann intense, nous n'en n'avons pas poursuivi l'étude.

Zone 2 :

Ne donne pas de spectre bien défini. Nous avons craint la présence d'esters d'acides gras, aussi avons-nous pratiqué une saponification à froid par la potasse méthanolique à 12 %. Après extraction de l'insaponifiable par l'éther de pétrole, lavage à l'eau et séchage sur sulfate de sodium anhydre, nous avons procédé à une deuxième chromatographie sur magnésie-célite 1 : 1. Le développement du chromatogramme par de l'éther de pétrole contenant 2 % d'acétone permet d'obtenir deux fractions :

a) La première fraction est incolore et présente dans l'ultra-violet une intense fluorescence bleu-ciel. Le spectre infra-rouge montre qu'il s'agit d'une substance à longue chaîne possédant, entre autres, une seule double liaison et une fonction cétone. Il n'y a ni noyau aromatique, ni groupe OH. L'étude de cette substance n'a pas été poursuivie (*).

b) La deuxième fraction est colorée en jaune pâle, le spectre montre un seul maximum à 441 m μ dans l'éther de pétrole, ce produit n'a pu être identifié, il s'agit peut-être d'un produit d'altération.

Contrairement à ce que nous pensions, ces différentes fractions ne contiennent ni phytoène, ni phytofluène.

Zone 3 :

Le spectre obtenu (400 - 424 - 450 - 475 m μ) est celui d'un mélange. Par chromatographie sur magnésie-célite 1 : 1 avec de

(*) Nous remercions bien vivement M. le Professeur GUY, de la Faculté de Pharmacie de Paris, pour la réalisation de ce spectre, et le Docteur CHOPARD, de Bâle, pour son interprétation.

TABLEAU N° 1
SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES CAROTÉNOÏDES
DE Rh. MUCILAGINOSA
(Les zones sont indiquées dans l'ordre croissant d'adsorption)

Zone	Couleur	Eluant
1	Incolore	Ether de pétrole
2	Jaune pâle, fluorescence bleu ciel, dans l'ultraviolet	Ether de pétrole + 5 % éther sulfurique
3	Orange	Ether de pétrole + 10 % éther sulfurique
4	Jaune pâle	Ether de pétrole + 15-20 % éther sulfurique
5	Orange	Ether de pétrole + 20-25 % éther sulfurique
6	Jaune pâle	Ether de pétrole + 25-30 % éther sulfurique
7	Rouge foncé	Ether sulfurique pur
8	Diffuse, formée en réalité de sept bandes peu nettes	Méthanol pur
9	Rouge foncé	Ether sulfurique + 5 % acide acétique

l'éther de pétrole à 5 % d'acétone, nous avons pu obtenir deux fractions :

a) Le pigment de la première fraction a été identifié au β carotène grâce aux caractères suivants :

— Le spectre d'absorption dans l'éther de pétrole présente des maxima situés à 424-450-477 m μ [425-450-477 m μ d'après GOODWIN (13)].

— D'autre part, la chromatographie sur magnésie-célite 1 : 1 du mélange avec du β carotène pur (Roche) fournit une bande unique.

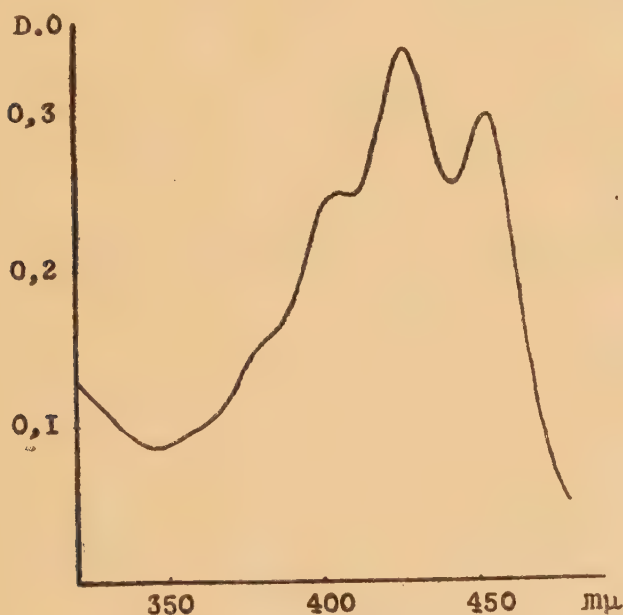


FIG. N° 1
Spectre du pigment X isolé de *Rh. mucilaginosa*.
Dans l'éther de pétrole.

b) Le pigment de la deuxième fraction interfère en partie avec le β carotène et n'a pu être séparé de ce dernier qu'avec difficulté. Entièrement épiphasique, ce pigment semble identique au *pigment X* (*) mis en évidence par CLAES (6) dans un mutant de *Chlo-*

(*) Nous remercions Mlle CLAES pour les commentaires qu'elle a bien voulu nous adresser concernant le pigment X.

rella vulgaris (algue) et présente les maxima suivants : 404-426-453 m μ (voir FIG. n° 1).

Zone 4 :

Le spectre indique que la séparation avec la zone précédente n'a pas été parfaite. Par contre, sur magnésie-célite 1 : 1 avec de l'éther de pétrole à 10 % d'acétone, nous séparons facilement deux fractions :

a) La première est constituée par le pigment X.

b) La deuxième est constituée par un pigment que nous avons identifié au γ carotène par ses caractères d'absorption et son spectre présentant les maxima suivants : 435-460-493 m μ [431-461-494 m μ d'après GOODWIN (20)].

Zone 5 :

Cette fraction est uniquement formée par du γ carotène déjà caractérisé dans la fraction 4.

Zone 6 :

Le comportement chromatographique et le spectre (voir FIG. n° 2) présentant des maxima situés à 415-439-469 m μ indiquent qu'il s'agit de *neurosporène* : 415-440-470 m μ d'après HAXO (27).

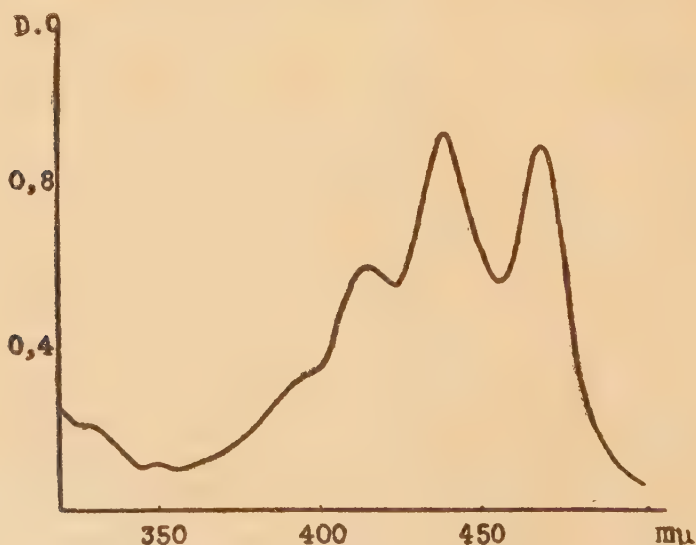


FIG. N° 2
Spectre du neurosporène isolé de *Rh. mucilaginosa*.
Dans l'éther de pétrole.

Zone 7 :

Le comportement chromatographique et le spectre (458-485-518 m μ) montrent qu'il s'agit de *torulène* ; ce pigment a été isolé par LEDERER de *Rh. rubra* (38) (voir FIG. n° 3).

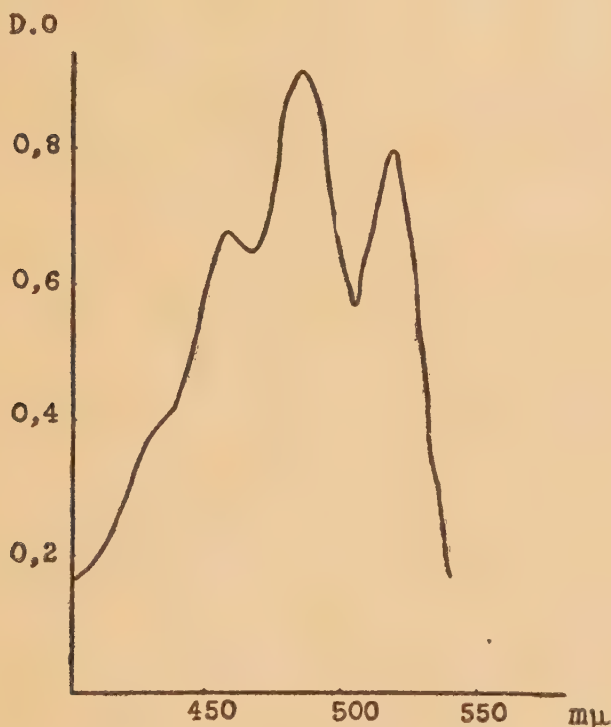


FIG. N° 3
Spectre du torulène isolé de *Rh. mucilaginosa*.
Dans l'éther de pétrole.

Zone 8 :

Les pigments, trop peu abondants, n'ont pu être séparés de manière satisfaisante.

Zone 9 :

Le pigment présente les caractères d'un acide et semble identique à la *torularhodine* isolée de *Rh. rubra* par KARRER et RUTSCHMANN (33). D'ailleurs ce caroténoïde a été également obtenu à

IV. — DOSAGE DES CAROTÉNOÏDES

Afin de diminuer les risques d'oxydation et d'isomérisation, nous avons travaillé sur des quantités de levure beaucoup plus faibles que précédemment (de l'ordre de quelques grammes) permettant une extraction et une séparation plus rapide des différents caroténoïdes.

Nous avons utilisé les coefficients d'extinction suivants : (voir Tableau n° 2) définis par la relation :

$$E_{1\% \atop 1\text{ cm}} = \frac{D \times 10}{C}$$

où D = densité optique

C = concentration en mg/ml.

Dans le tableau n° 3 nous indiquons les résultats obtenus dans 4 dosages pratiqués sur 4 cultures différentes de *Rhodotorula mucilaginosa*.

Les variations observées peuvent être dues à plusieurs causes :

1° à des isomérisations ou des oxydations. Les précautions que nous avons prises lors des manipulations nous incitent à penser qu'il ne s'agit pas là de facteurs prépondérants.

2° à la variabilité du matériel étudié. Il est peu probable en effet que plusieurs échantillons de levure, cultivés dans des conditions aussi semblables que possible, aient une composition identique.

3° à la précision des mesures. Ce facteur est certainement négligeable devant le précédent.

TABLEAU N° 2

DONNÉES SPECTROGRAPHIQUES POUR LE DOSAGE DES CAROTÉNOÏDES
DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

<i>Caroténoïde</i>	<i>Position des maxima d'absorption dans l'éther de pétrole</i>		<i>E_{1 cm}^{1 %} pour le maximum principal</i>	<i>Références bibliographiques</i>
Phytoène	275	285 296	850	(51)
Phytofluène	332	348 367	1.540	(34)
β carotène	424	450 477	2.590	(12)
ζ carotène	378	399 424	2.500	(44)
γ carotène	435	460 491	2.760	(20)
Neurosporene	415	439 469	2.990	(27)
Lycopène	446	474 506	3.460	(66)
Torulène	458	484 518	2.680	(38)
Spirilloxanthine ..	466	494 528	2.360	(48)
Torularhodine ...	474	500 533	2.580	(33)

TABLEAU N° 3

DOSAGES COMPARATIFS DES CAROTÉNOÏDES DE *Rh. MUCILAGINOSA*
(Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de levure sèche)

	<i>Culture</i> N° 1	<i>Culture</i> N° 2	<i>Culture</i> N° 3	<i>Culture</i> N° 4
Torularhodine ...	97,80	85,02	90,30	101,60
Torulène	15,60	19,70	16,50	16,80
Neurosporène	traces	0,62	0,40	traces
γ carotène	1,36	0,98	1,14	0,89
β carotène	5,57	6,45	5,23	5,38
<i>Total</i>	120,33	112,77	113,57	124,67

V. — DISCUSSION ET RÉSUMÉ

ZOPF (67) a été le premier à mentionner la présence de caroténoïdes chez les levures rouges, mais c'est à CHAPMAN (5) que l'on doit la constatation que le pigment extrait de ces levures est différent du β carotène. Plus récemment, LEDERER (38) a isolé de trois souches de *Rh. rubra* le torulène et le β carotène à l'état cristallisé et mis en évidence la torularhodine et un autre pigment instable.

FROMAGEOT et TCHANG (11) ont pu caractériser dans une variété de *Rh. sanniei* : la torularhodine, le torulène, le β carotène ainsi que des traces de γ carotène et de lycopène.

BONNER et coll. (4) n'ont pu mettre en évidence la torularhodine dans leur souche de *Rh. rubra* mais trouvent du neurosporène et du phytofluène à côté de torulène, γ carotène, β carotène.

WITTMAN (64) signale chez *Rh. rubra* la présence de torularhodine, torulène, γ carotène, β carotène ; PETERSON (46) confirme ce résultat et trouve une composition semblable pour *Rh. mucilaginos*a.

Les résultats que nous apportons corroborent et complètent ceux de nos prédécesseurs et peuvent être résumés ainsi :

Notre souche de *Rhodotorula mucilaginos*a contient 4 pigments principaux : *torularhodine*, *torulène*, γ *carotène*, β *carotène*. En plus nous trouvons en petite quantité du *neurosporène* et enfin, sous forme de traces n'ayant pu être dosées, *un pigment X*, sans doute identique à celui de CLAES (6), dont c'est la première fois que l'on signale la présence chez une levure.

CHAPITRE II

OBTENTION DE MUTANTS PAR IRRADIATION ULTRAVIOLETTE

ANALYSE DE LEURS PIGMENTS

Depuis plusieurs années, le problème de la caroténogénèse a été abordé sous un angle nouveau grâce à l'étude de mutants naturels ou artificiels obtenus en particulier chez divers microorganismes : *Neurospora crassa* (27), *Phycomyces blakesleanus* (14), *Corynebacterium michiganense* (54), *Rhodopseudomonas spheroides* (25), *Chorella vulgaris* (7).

En ce qui concerne, plus spécialement, l'étude de la biosynthèse des caroténoïdes chez les levures rouges, nous ne trouvons guère que le travail de BONNER et coll. (4) concernant *Rhodotorula rubra*.

I. — OBTENTION DES MUTANTS

A) Technique

A l'irradiation des cellules en suspension dans un liquide agité, nous avons préféré la méthode suivante, plus facile à mettre en œuvre :

La levure est mise en suspension dans l'eau distillée stérile puis diluée de façon à avoir environ 1.000 cellules par ml. Un volume connu de cette dilution est étalé à la surface d'un milieu nutritif coulé en boîtes de Pétri.

Le générateur de rayons ultraviolets que nous utilisons est du type « Germicide », il se présente sous forme d'un tube de 110 mm de longueur et de 5 mm de diamètre extérieur (tube 123-100 Anciens Etablissements Gallois et Cie, Paris), fonctionnant sous haute tension et basse pression. Le spectre d'émission de ce tube est surtout représenté par la raie 2537 angströms. Le générateur est mis en fonctionnement 1 heure avant le début de chaque irradiation de façon à obtenir une émission stable ainsi qu'une stérilisation suffisante de l'espace où se déroulent les manipulations.

Ne possédant pas de boîtes en quartz, nous portons notre boîte de Pétri à environ 100 mm de la lampe et enlevons le couvercle qui est gardé dans le champ de la lampe pendant la durée de l'irradiation.

Nous remplaçons ensuite le couvercle sur la boîte qui est portée à l'étuve à 30° pendant 48 heures. Une boîte de Pétri préparée dans les mêmes conditions, mais non irradiée, sert de témoin. Sauf indication contraire, le temps d'irradiation, déterminé par des essais préliminaires, a été de 4 minutes.

B) Résultats expérimentaux

A partir d'une de nos cultures conservée sur milieu semi-synthétique, une souche pure de *Rhodotorula mucilaginosa* a été constituée par isolement d'une seule cellule au micromanipulateur. Cette souche mère sera désignée dans la suite du travail par RMP.

En soumettant cette dernière à l'action de l'ultraviolet dans les conditions exposées ci-dessus, nous avons obtenu, avec un taux de mortalité de 98 %, des colonies rose pâle ne présentant entre elles aucune différence macroscopique. Une de ces colonies est prélevée, une fraction en est repiquée sur milieu solide et constitue la souche RIN, l'autre fraction sert à préparer les dilutions qui subiront une nouvelle irradiation.

Celle-ci permet d'obtenir au bout de 48 heures une colonie jaune (RJ1), une colonie orange (RO1) et une dizaine de colonies blanches dont une seule est conservée. A partir de ces différentes colonies, des souches pures sont obtenues en isolant une cellule au micromanipulateur. Il faut noter que dans cette expérience, le taux de mortalité n'a été que de 80 % au lieu de 98 % dans l'irradiation précédente.

A ce stade de nos recherches, nous avons pensé que l'atténuation de la pigmentation des levures sous l'influence de l'irradiation était en quelque sorte un phénomène progressif, des cellules étaient devenues blanches parce que le mécanisme de leur caroténogénèse avait subi une atteinte plus profonde que les cellules jaunes, celles-ci ayant été plus sérieusement atteintes que les cellules oranges.

Pour tenter de le démontrer, nous avons réirradié la souche RJ1 dans les mêmes conditions, avec la pensée que nous obtiendrions des colonies blanches ; cependant sur 30.000 cellules ensemencées, nous n'avons décelé, après une nouvelle exposition aux u.v. identique aux précédentes, aucune colonie blanche. Nous avons prélevé une colonie au hasard qui, après culture, nous a donné la souche RJ2. Cette dernière a été à son tour soumise aux u.v. sans modification notable de la pigmentation et une colonie a été cultivée, elle a donné la souche RJ3.

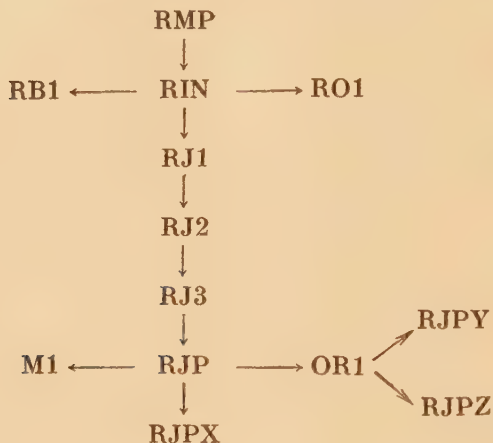
L'irradiation de cette nouvelle souche RJ3 aboutit à l'obtention d'une seule colonie jaune pâle (RJP) au milieu de colonies apparemment inchangées. Ce résultat nous confirmait dans la pensée que l'irradiation aboutit à une décoloration progressive mais, si une nouvelle exposition à l'ultraviolet de RJP nous a permis d'observer une colonie jaune très pâle (RJPX) et une cinquantaine de colonies blanches, dont l'une constituera la souche M1, la présence d'une colonie orange (OR1) venait infirmer notre hypothèse, l'irradiation pouvait aussi bien augmenter la pigmentation que la diminuer.

Ce résultat nous a incité à poursuivre les irradiations afin d'essayer d'obtenir une souche dont la pigmentation serait aussi voisine que possible de celle de la souche mère.

OR1 a donc été soumis à l'irradiation dans les mêmes conditions que les souches précédentes et après deux tentatives infructueuses nous avons obtenu : deux colonies dont l'une, rose orangé, constituera la souche RJPY et l'autre, orangé foncé, la souche RJPZ.

Toutes ces souches, dont nous donnons ci-dessous le schéma de filiation, sont stables depuis leurs isollements qui datent en moyenne de quatre ans.

Schéma résumant la filiation des différentes souches venant d'être décrites



Malgré les précautions prises au cours des différentes manipulations, il nous a paru utile de vérifier que nos nouvelles souches appartenaient bien toujours à l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* (*). Toutes les souches colorées ont bien conservé les caractères essentiels qui permettent de les ranger dans l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa*. Il n'en va pas de même pour les mutants blancs puisqu'une des caractéristiques essentielles du genre *Rhodotorula* est une coloration allant du jaune au rouge.

NAKAYAMA et coll. (42) considèrent que la différenciation des genres *Cryptococcus* et *Rhodotorula*, basée respectivement sur l'absence ou la présence de caroténoïdes, est arbitraire et suggèrent que la distinction soit faite d'après la production ou non « d'amidon ».

Cette manière de procéder ne lève cependant pas toute indétermination, des levures comme *Rhodotorula glutinis* variété *infir-mo-miniata* produisent de « l'amidon ».

Connaissant l'origine de nos souches blanches, il était difficile d'admettre que ces levures appartenaient à une autre espèce que *Rhodotorula mucilaginosa* et cependant certains auteurs n'hésitent pas à annoncer la création de nouvelles espèces par simple irradiation ultraviolette (37).

(*) Le Centraal Bureau voor Schimmelcultures a bien voulu se charger de cette vérification.

Nous préférons cependant, dans notre cas, nous ranger à l'avis de EPHRUSSI (*) et de WINGE (*) et considérer qu'il s'agit bien de « mutants blancs » de *Rh. mucilaginos*a.

II. — PRINCIPALES PROPRIÉTÉS DES MUTANTS OBTENUS

Le rôle physiologique des caroténoïdes, surtout en ce qui concerne les microorganismes dépourvus de chlorophylle, reste pratiquement inconnu.

LUTERAAN et coll. (39) ont supposé que ces pigments intervenaient dans la respiration mais sans preuve expérimentale sérieuse. D'un autre côté, GUIRARD et coll. (25) ont montré que les caroténoïdes peuvent remplacer l'acétate de sodium dans la croissance d'un bacille lactique.

HÉRISSET (28) a trouvé qu'en additionnant le milieu de culture de β carotène, la respiration de *Saccharomyces cerevisiae* cessait d'une façon pratiquement totale pour faire place à la glycolyse aérobie. Il est probable, dans ce dernier cas tout au moins, que l'on puisse attribuer ce résultat aux puissantes propriétés anti-oxygène du β carotène (3).

Ayant à notre disposition des souches mutantes de *Rh. mucilaginos*a dont certaines ne contiennent pratiquement plus de caroténoïdes, les observations ci-dessus nous ont incité à étudier d'une part la croissance, d'autre part la respiration de quelques mutants, espérant ainsi pouvoir mettre en évidence des différences de comportement qui auraient, éventuellement, pu être rapportées à la présence ou à l'absence de caroténoïdes.

A) Croissance

Au cours de nombreuses cultures, nous avons pu constater que la quantité de matière vivante formée par les différents mutants est sensiblement la même pour un même milieu de culture, mais que le temps nécessaire pour obtenir ce résultat est fort variable. Autrement dit, la différence essentielle réside dans la vitesse de croissance ; c'est donc ce dernier phénomène que nous avons étudié. Nous donnons ci-dessous le « temps moyen de génération »,

(*) Nous remercions tout particulièrement MM. les Professeurs B. EPHRUSSI et Ö. WINGE pour les commentaires qu'ils nous ont adressés au sujet de nos mutants.

c'est-à-dire le temps moyen nécessaire à la division d'une cellule, calculé d'après la formule :

$$G = \frac{t \times \log 2}{\log b - \log B}$$

ou t = intervalle de temps séparant le début de la fin de la phase exponentielle de croissance.

B = densité optique de la culture au début de la phase exponentielle de croissance.

b = densité optique de la culture à la fin de la phase exponentielle de croissance.

Nous avons ainsi obtenu pour les différentes souches les temps moyens de génération suivants, exprimés en minutes :

RMP	RB1	RO1	RJ1	RJP	M1	RJPX	OR1	RJPY
240	210	220	240	340	360	360	300	340

Ces résultats montrent clairement qu'il n'y a, dans nos conditions expérimentales, aucune relation entre la croissance et la nature ou la proportion des différents caroténoïdes. En effet, une souche comme RB1 qui ne contient pratiquement plus de caroténoïdes est douée d'une vitesse de croissance identique à celle de la souche mère ou à celle de RJ1 dont la composition en pigments, nous le verrons plus loin, est très différente de celle des deux autres.

De plus les vitesses de croissance des deux mutants blancs RB1 et M1 sont très différentes, ce qui laisse supposer que les mutations intervenues dans la création de ces souches n'intéressent pas uniquement le métabolisme des caroténoïdes.

B) Respiration

Nous avons étudié comparativement la respiration de la souche mère et celle de deux mutants : RB1 et RO1, les différences entre ces souches au point de vue teneur en caroténoïdes nous ayant paru suffisantes pour tirer une conclusion valable quant à l'influence éventuelle de ces pigments sur la respiration.

Nous nous sommes d'abord posé la question de savoir si les caroténoïdes avaient une influence sur la respiration endogène des cellules. Pour les trois souches déjà citées, nous avons étudié cette respiration en fonction de l'âge des cellules. En effet, quelle que

soit la souche étudiée, la quantité de caroténoïdes est différente selon que la culture est prélevée au début ou au milieu de la phase de croissance exponentielle ou après arrêt de la croissance, lorsque la caroténogénèse est à son maximum.

La levure est rapidement séparée de son milieu par centrifugation aux environs de 0° , lavée trois fois avec une solution de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K M}/15$, pH 4,6 et remise en suspension dans la même solution. Entre la récolte et le début des mesures il s'écoule environ 1 heure.

Nous avons utilisé la méthode manométrique classique de WARBURG (60) à l'aide de l'appareil modèle S construit par la firme Braun (Melsungen, Allemagne).

Le volume du liquide est de 3 ml par fiole et les mesures sont faites à 30° sur les cellules mises en suspension dans du phosphate monopotassique M/15, pH 4,6. L'absorption du gaz carbonique est réalisée par 0,3 ml de potasse à 20 % placée dans la cupule centrale de la fiole. Afin d'augmenter la surface d'absorption, nous avons placé dans la solution de potasse un petit carré de papier filtre plissé de $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$. L'agitation des manomètres est de 100 oscillations simples par min. avec un arc de 5 cm. Le pH du liquide étant inférieur à 5, nous n'avons pas appliqué de correction pour la rétention du gaz carbonique, qui dans ces conditions est négligeable. La durée maximum d'une expérience a été de 4 heures, nous avons vérifié par des examens microscopiques et par des isollements sur boîtes de Pétri que dans les conditions où nous opérons, la contamination bactérienne est négligeable.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau n° 4 où Qo_2 représente le nombre de mm^3 d'oxygène absorbés pendant une heure par mg de poids sec de la préparation dans l'air. Chaque nombre est la moyenne de 5 expériences au moins, réalisées à des temps différents dans des conditions semblables, chaque expérience représentant la moyenne de 7 manomètres.

Nous constatons qu'il n'y a aucune différence significative entre les valeurs obtenues pour les trois souches, cultivées et récoltées dans des conditions identiques. Il est donc vraisemblable, là encore, que les caroténoïdes ne jouent aucun rôle dans la respiration des réserves intracellulaires.

Notons au passage la diminution de la vitesse de respiration endogène avec le temps, ce qui est en accord avec les résultats trouvés par plusieurs auteurs pour d'autres levures, *Saccharomyces* en particulier (56).

TABLEAU N° 4

INFLUENCE DU TEMPS DE CULTURE SUR LA RESPIRATION ENDOGÈNE

Temps en heures	Q _O ₂ des cellules récoltées au bout de								
	7 heures			12 heures			30 heures		
	RMP	RO1	RB1	RMP	RO1	RB1	RMP	RO1	RB1
1	28,2	21,3	25,4	25,4	26,7	24,5	10,2	9,8	9,5
2	26,7	22,1	24,4	25,2	24,2	23,7	9,6	9	8,9
3	17,4	14,6	15,9	19,8	21,1	17,3	6,3	6,1	5,9
4	10,5	9,6	9,8	9,3	10,7	11,4	4,1	3,9	3,2

La respiration en présence de glucose par les trois souches RMP, RO1, RB1 a été étudiée dans les mêmes conditions que la respiration endogène, la seule différence étant l'addition, dans chaque fiole, de glucose à 3 %. Dans ces conditions les valeurs extrêmes du Q_O₂ ont été les suivantes :

RMP : 79,3 — 97,5

RO1 : 86,6 — 112,3

RB1 : 72,7 — 91

Les écarts enregistrés entre les trois souches sont minimes et pour une même souche la variation avec l'âge n'est pas significative. Les caroténoïdes n'apportent donc pas de modification dans l'intensité respiratoire en présence de glucose.

III. — ANALYSE DES CAROTÉNOÏDES DES SOUCHES MUTANTES

Nous avons vu, au début de ce chapitre, que les souches mutantes faisant l'objet de cette étude ont été sélectionnées d'après un caractère facilement apparent : leur coloration. Or, il est vraisemblable que cette dernière est surtout sous la dépendance de la nature des caroténoïdes présents dans chacune d'elle et nous rapportons ci-dessous nos résultats en ce qui concerne la composition de chaque souche.

Les techniques utilisées sont essentiellement les mêmes que celles indiquées à propos de la souche mère. Les résultats, représentant les moyennes d'au moins deux expériences réalisées dans des conditions identiques, sont indiqués dans le tableau n° 5.

Les mutants RB1 et M1 ne contenant plus de caroténoïdes ne figurent pas dans le tableau.

MUTANT RB1

Malgré sa coloration blanche, nous avons pu mettre en évidence, opérant sur 200 g de levure, *des traces de β carotène*. La mutation a donc provoqué, chez cette souche, une abolition pratiquement totale de la synthèse des polyènes : nous n'avons pas pu, notamment, trouver d'accumulation de phytoène ou de phytofluène, corps considérés par plusieurs auteurs comme étant les précurseurs des caroténoïdes.

MUTANT RJ1

Malgré sa coloration jaune, nous avons pu caractériser chez ce mutant la *torularhodine*, le torulène n'a pu être décelé.

Par contre, il faut noter la présence d'un caroténoïde que nous n'avons jamais rencontré dans la souche mère : *le ζ carotène*. De couleur verte en solution dans l'éther de pétrole, il est adsorbé sur colonne de magnésie entre le β carotène et le γ carotène.

Le spectre effectué dans l'éther de pétrole nous a fourni les valeurs suivantes : 378-399-424 m μ (voir FIG. n° 5). NASH et ZSCHEILE (45) donnent 378-400-425 m μ .

En outre, nous avons pu montrer chez ce mutant la présence de *neurosporène*, γ carotène, β carotène.

TABLEAU N° 5

TENEUR DE Rh. MUCILAGINOSA ET DE SES MUTANTS EN POLYÈNES

Les résultats sont la moyenne d'au moins deux expériences, ils sont exprimés en µg/g.

Les nombres entre parenthèses indiquent, pour chaque souche, le pourcentage de chacun des pigments dosés par rapport au total.

	RMP	RO1	RJ1	RJP	RJPX	OR1	RJPY
Torularhodine .	97,8 (81,27)	—	4,78 (4,85)	4,61 (3,62)	3,02 (2,98)	4,55 (3,13)	?
Spirilloxanthine.	—	—	—	—	—	—	1,52 (2)
Lycopène	—	—	—	—	—	—	65,66 (86,4)
Torulène	15,6 (12,96)	8,9 (16,51)	?	?	1,83 (1,82)	0,26 (0,18)	—
Neurosporene ..	—	—	5,22 (5,30)	4,79 (3,77)	5,03 (4,98)	5,1 (3,51)	3,29 (4,32)
γ carotène	1,36 (1,13)	8,5 (15,77)	41,43 (42,11)	35,38 (27,85)	19,37 (19,23)	46,43 (31,98)	—
ζ carotène	—	—	6,35 (6,45)	2,23 (1,75)	7,76 (7,68)	9 (6,19)	2,90 (3,82)
Pigment X	traces	1,6 (2,97)	—	—	—	—	—
β carotène	5,57 (4,62)	34,88 (64,73)	40,6 (41,26)	80,3 (63,07)	54,41 (53,90)	74,93 (51,61)	—
Phytofluène ...	—	—	—	—	9,52 (9,43)	4,90 (3,37)	2,69 (3,52)
<i>Total</i>	120,33	53,88	98,38	127,31	100,94	145,17	76,05

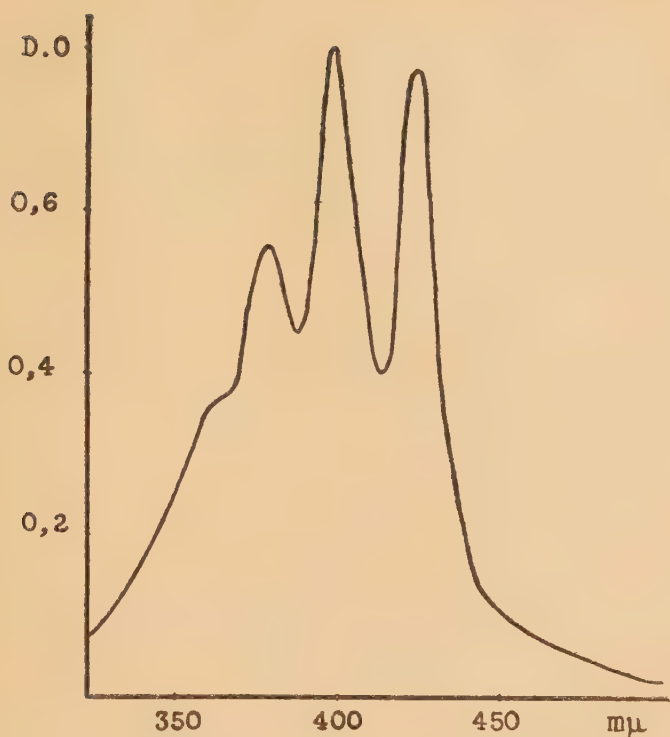


FIG. N° 5
Spectre du ζ carotène isolé de RJ1.
Dans l'éther de pétrole.

MUTANT RJP

Ce mutant de couleur plus pâle que le précédent, contient *les mêmes pigments* que RJ1, y compris la torularhodine.

MUTANT M1

Malgré nos nombreux essais, nous avons toujours dû constater l'absence de pigment ainsi que de phytoène et phytofluène.

MUTANT RJPX

A l'exception du pigment X qui n'a pas pu être caractérisé, ce mutant contient tous les pigments rencontrés dans la souche mère, c'est-à-dire : *torularhodine*, *torulène*, γ carotène, β carotène. En

outre, de même que chez les deux autres mutants jaunes RJ1 et RJP nous avons pu caractériser le ζ carotène. Enfin, c'est la première de nos souches dans laquelle il nous a été possible de mettre en évidence le *phytofluène* que nous avons caractérisé grâce à son intense fluorescence bleu-vert dans l'ultraviolet, son absorption au-dessous du β carotène et son spectre : 330-348-368 m μ (voir Fig. n° 6) [332-348-367 m μ d'après BONNER et coll. (4)].

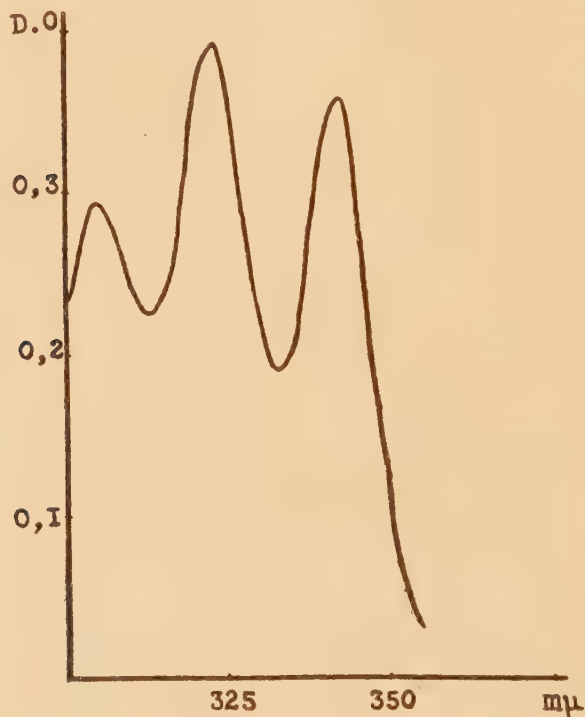


FIG. N° 6
Spectre du phytofluène isolé de RJPX.
Dans l'éther de pétrole.

De plus nous avons confirmé que le polyène que nous avons isolé était bien du phytofluène par chromatographie de son mélange avec du phytofluène que nous avons isolé d'un concentré de tomates selon la technique de RABOURN et coll. (52).

MUTANT OR1

Cette souche, de coloration assez différente de celle du mutant RJPX, ne présente cependant, avec ce dernier aucune différence qualitative dans sa composition en caroténoïdes. Nous avons en effet pu caractériser : la *torularhodine*, le *torulène*, *neurosporène*, γ carotène, ζ carotène, β carotène et *phytofluène*.

MUTANT RJPY

L'analyse de ce mutant, dont la coloration est voisine de celle de OR1, nous a réservé une grande surprise car cinq des pigments rencontrés chez son précurseur immédiat (OR1) ont disparu et seuls le ζ carotène et le *neurosporène* subsistent.

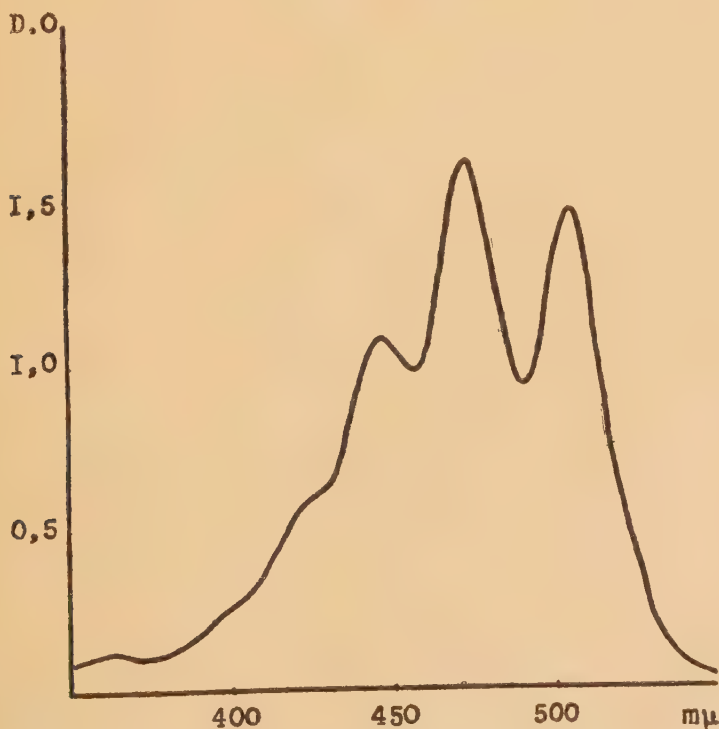


FIG. N° 7
Spectre du lycopène isolé de RJPY.
Dans l'éther de pétrole.

Par contre, le *lycopène* s'y trouve en quantité relativement élevée et nous avons pu isoler ce caroténoïde à l'état cristallisé. Il a été caractérisé par son spectre d'absorption dans l'éther de pétrole : 446-474-506 m μ (voir FIG. n° 7) [446-474-506 d'après ESCHER (10)] et par chromatographie du mélange avec du lycopène pur provenant de la firme Fluka.

A notre connaissance, le lycopène n'a été mis en évidence chez les levures rouges que dans un seul autre cas, celui d'une variété de *Rh. sarniei* étudiée par FROMAGEOT et TCHANG (11).

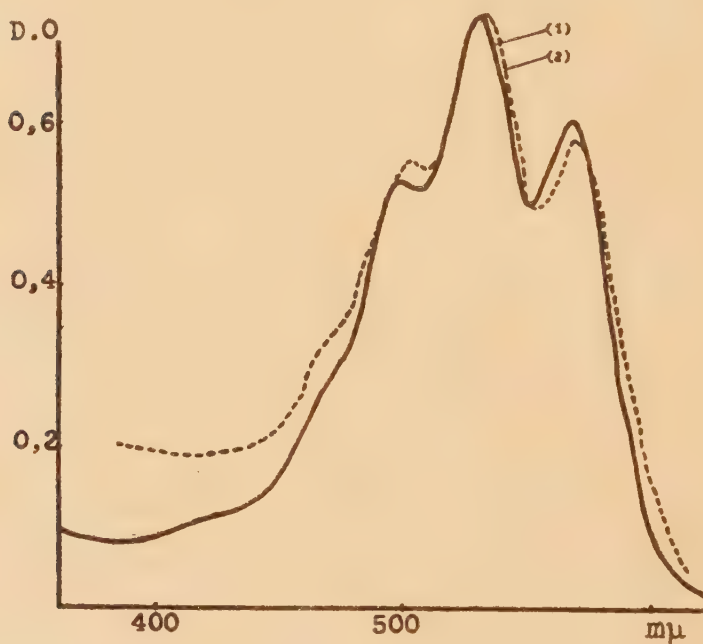


FIG. N° 8
Spectre de la Rhodoviolascine dans le sulfure de carbone.
1. D'après POLGAR et coll.
2. A partir de RJPY.

Enfin, adsorbé au-dessus du lycopène, nous avons trouvé un pigment que ses caractères d'adsorption et son spectre 504-535-572 m μ dans le sulfure de carbone (voir FIG. n° 8), 466-494-528 m μ dans l'éther de pétrole (voir FIG. n° 9), nous ont permis de l'identifier à la *rhodoviolascine* 500-532-570 m μ dans le sulfure de carbone

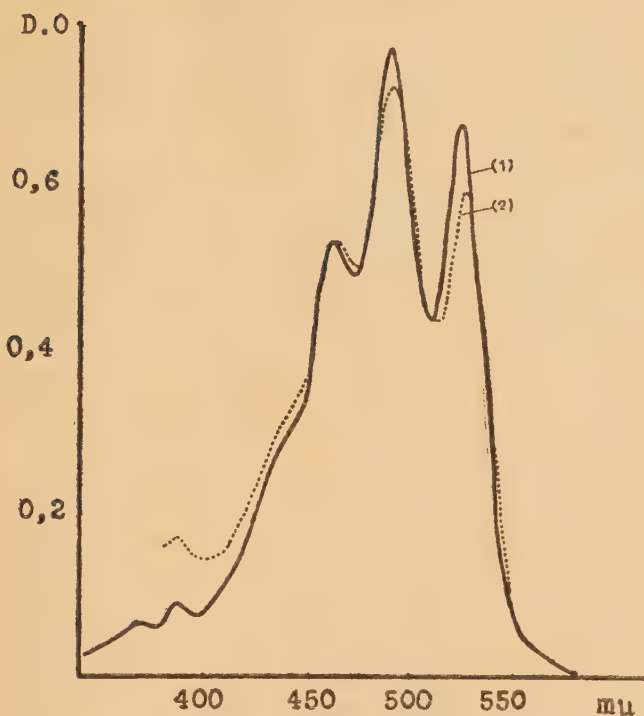


FIG. N° 9

Spectre de la Rhodoviolascine dans l'éther de pétrole.

1. D'après POLGAR et coll.

2. A partir de RJPY.

et 466-494-528 mμ dans l'éther de pétrole d'après KARRER et SOLMSEN (32). C'est la première fois, semble-t-il, que ce pigment qui constitue la majeure partie des caroténoïdes de certaines bactéries photosynthétiques (48) est mentionné chez une levure rouge.

IV. — RÉSUMÉ

Si l'on excepte les souches RB1 et M1 qui ne contiennent pratiquement pas de caroténoïdes, certaines comme RO1 et RJPY sont sensiblement moins riches en pigments que la souche mère, d'autres présentent un taux de caroténoïdes du même ordre ou parfois supérieur à celui de leurs précurseurs. Même lorsque le taux des

pigments totaux est peu modifié, des différences considérables peuvent être notées dans la teneur en certains caroténoïdes d'une souche à l'autre. C'est ainsi que la torularhodine qui forme les 4/5 des pigments de la souche mère n'existe plus, ou en quantité inférieure à 5 %, chez les mutants.

Au contraire le β carotène qui représente moins de 5 % des pigments de RMP, forme plus de 60 % de ceux de RO1 et RJP. Le γ carotène passe de 1 % chez RMP à 42 % chez RJ1. Des pigments qui n'existaient pas dans la souche mère peuvent apparaître chez les mutants : ainsi le lycopène forme 86 % des pigments de RJPY.

CHAPITRE III

INFLUENCE D'AGENTS CHIMIQUES SUR LA CAROTÉNOGÉNÈSE DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

I. — INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence des variations qualitatives et quantitatives de la teneur de *Rhodotorula mucilaginosa* en différents pigments consécutives à des mutations. Ces dernières se produisant au hasard, il nous a paru intéressant d'essayer de modifier la pigmentation de notre levure d'une manière fidèle et reproductible. En effet, si à l'aide de composés chimiques définis nous pouvions, à notre gré, modifier la composition qualitative et quantitative de la levure, en caroténoïdes, nous posséderions alors un moyen d'étude du mécanisme de la biosynthèse de ces pigments. Il s'agirait donc, pour nous, de mettre en œuvre des inhibiteurs spécifiques de la caroténogénèse. Peu de substances possèdent une telle propriété, la plupart des corps utilisés ont une action sélective (35), c'est-à-dire qu'ils possèdent une spécificité étroite mais non absolue.

Il faut d'ailleurs remarquer que, par un abus de langage, on emploie le terme de « inhibiteur de la caroténogénèse » alors qu'il s'agit le plus souvent de corps inhibant la synthèse de certains caroténoïdes, mais non de tous, et il n'est pas rare de lire qu'après emploi d'un inhibiteur, le microorganisme ne contient plus de β carotène mais contient encore du ζ carotène.

Dans nos expériences nous nous sommes adressé d'une part à des agents dont l'action inhibitrice sur la caroténogénèse était reconnue (phénol, diphénylamine, etc...), d'autre part à des corps dont nous avons mis en évidence, pour la première fois, une action anticaroténogène.

II. — RÉSULTATS

1) Phénol

TURIAN (59) a mis en évidence son action puissante sur la caroténogénèse de *Mycobacterium phlei* ; il ne semble pas toutefois qu'il s'agisse là d'une propriété générale puisque le phénol est sans action par exemple sur *Phycomyces* (15). De plus, la souche de *Mycobacterium* utilisée par TURIAN paraît avoir présenté d'après GOODWIN et coll. (22) une sensibilité inhabituelle.

Nous avons essayé le phénol sur *Rh. mucilaginosus*, les résultats ont été difficiles à interpréter car il ne nous a pas été possible de dissocier l'action sur la croissance de celle sur la caroténogénèse.

2) Phényléthylacétamide

Ce composé commercialisé sous le nom d'« hypostérol » est utilisé en thérapeutique comme hypocholestérolémiant. Malgré de nombreux travaux, le mode d'action de cette amide reste hypothétique, il semble cependant que ce soit la synthèse de l'acétyl CoA ou de l'acétoacétyl CoA qui soit inhibée (41). Nous avons pensé que l'hypostérol pourrait être un inhibiteur de la caroténogénèse si, comme cela a été avancé, l'acétate en était bien le précurseur lointain.

En fait pour des concentrations inférieures à 1 mg/ml la croissance et la caroténogénèse ne sont pratiquement pas perturbées. Pour des concentrations de 1 à 2 mg/ml, l'inhibition de la caroténogénèse va de pair avec celle de la croissance. La levure est à la fois moins abondante et moins colorée rendant donc difficile l'analyse du phénomène.

3) Hydrocarbures à noyaux condensés

ARK (1) étudiant l'action du naphthalène, de l'acénaphène et de leurs dérivés sur la chromogénèse de *Corynebacterium michiganense* et de *Xanthomonas juglandis*, semble avoir obtenu dans quelques cas de véritables mutations tandis que dans les autres cas, il s'agit vraisemblablement d'une simple inhibition de la chromogénèse.

En utilisant ces observations comme idée directrice, nous avons pensé tester l'action de divers hydrocarbures sur la caroténogénèse : naphthalène, acénaphène, phénanthrène. L'action sur la croissance a été relativement faible comme l'indique le tableau n° 6.

L'acénaphène :

Non seulement n'a manifesté aucune action inhibitrice mais a toujours conduit, après plusieurs essais, à une levure plus colorée que le témoin même pour des concentratons atteignant 4.10^{-3} g/l.

Le naphthalène :

Retarde simplement l'apparition de la pigmentation qui ne commence à être visible qu'à partir de la 16^e heure lorsque la densité optique de la culture atteint déjà 0,63 alors que la coloration du témoin est déjà parfaitement perceptible pour une densité optique de 0,30 environ.

En fin de croissance, la levure ayant poussé en présence de naphthalène présente une teinte et une intensité de coloration comparables à la culture témoin.

Le phénanthrène :

Comme le naphthalène, retarde l'apparition de la pigmentation mais la levure présente en fin de croissance une coloration rose orangé que nous n'avions jamais obtenue jusqu'alors.

Ces résultats bien que présentant un certain intérêt, puisque deux des trois corps essayés ont certainement modifié la caroténogénèse, ne nous ont pas paru assez nets pour justifier, pour l'instant, une étude plus approfondie car nous avons trouvé dans la série du biphenyle des inhibiteurs beaucoup plus actifs.

TABLEAU N° 6

ACTION SUR LA CROISSANCE DE Rh. MUCILAGINOSA
D'HYDROCARBURES A NOYAUX CONDENSÉS

<i>Inhibiteur</i> 200 µg/ml	<i>Densité optique × 100 mesurée au bout de</i>						
	12 h.	14 h.	16 h.	18 h.	20 h.	24 h.	38 h.
Témoin	50	64	76	83	88	96	105
Acénaphène ..	32	41	54	64	75	89	105
Naphtalène	38	49	63	73	83	93	103
Phénanthrène .	45	57	70	79	86	95	101

4) Streptomycine

Chez *Phycomyces blakesleeanus*, la streptomycine agit sélectivement sur la caroténogénèse mais uniquement si la source azotée est l'asparagine. En effet, si on remplace l'asparagine, partiellement ou totalement, par un sel d'ammonium, la streptomycine n'agit plus. De même dans un milieu contenant de l'acétate sans glucose, la streptomycine inhibe d'une façon identique la croissance et la caroténogénèse de *Phycomyces blakesleeanus*, si bien que la concentration en pigment reste constante (21).

Chez *Rhodospirillum rubrum*, bien qu'inhibant la croissance, cet antibiotique n'a pratiquement pas d'action sur la pigmentation (16).

Par contre, chez une Euglène Sp, la destruction des chloroplastes par la streptomycine est accompagnée d'une inhibition marquée mais non totale de la synthèse des caroténoïdes (19).

L'utilisation de la streptomycine comme inhibiteur de la pigmentation des levures rouges a fait l'objet d'une étude de BERTOSI et CIFERRI chez *Rh. rubra* (2). Ces auteurs trouvent que la streptomycine, à des concentrations allant de 10^{-5} à 10^{-3} g/l, est sans action sur la croissance comme sur la teneur en torularhodine, torulène, β carotène et γ carotène.

Les expériences que nous avons réalisées avec *Rh. mucilaginosa* montrent que cette levure est très peu sensible à la streptomycine, ce qui ne nous a pas surpris, les levures étant très résistantes aux antibiotiques. Que la source azotée soit sous forme d'asparagine ou de sulfate d'ammonium, ni la croissance, ni la caroténogénèse n'ont été modifiées pour des concentrations en antibiotique allant de 2.10^{-5} à 2.10^{-2} g/l.

5) Diphénylamine (*)

KARASCH, CONWAY et BLOOM (31) avaient montré que la chromogénèse est inhibée chez plusieurs bactéries et champignons par la diphénylamine. TURIAN (58) reprenant ces observations montre que cette substance, aux concentrations de 1/20.000 et 1/35.000 inhibe la caroténogénèse de *Mycobacterium phlei*. GOODWIN (12) a étudié l'action de cette amine sur *Phycomyces blakesleeanus* et a pu montrer que la production des α , β et γ carotènes et celle du

(*) Ce composé sera désigné dans la suite du travail par DPA.

lycopène est pratiquement abolie tandis que la teneur en phytoène, phytoflène, ζ carotène et neurosporène est nettement augmentée. Bien que de nombreux chercheurs aient utilisé la DPA pour inhiber la caroténogénèse, le mode d'action de ce composé est resté inconnu ; d'ailleurs, le métabolisme des caroténoïdes n'est probablement pas seul à être perturbé car, dans bien des cas, la croissance a été fortement diminuée sinon totalement empêchée, GOODWIN (17).

A notre connaissance, peu de travaux mentionnent l'utilisation de la DPA dans l'étude de la caroténogénèse chez les levures appartenant au genre *Rhodotorula* :

SLECHTA et coll. (55) ont montré que dans le cas de *Rhodotorula gracilis*, une concentration de $4,5 \cdot 10^{-5}$ g/l inhibe totalement la synthèse des pigments.

Le même phénomène est obtenu par WITTMAN (64), en utilisant *Rhodotorula rubra*.

Sur notre souche de *Rh. mucilaginosa*, la DPA exerce une puissante action anticaroténogène mais l'inhibition ne semble totale que pour des concentrations de 4 à $5 \cdot 10^{-5}$ g/l.

Le tableau n° 7 montre que l'action sur la caroténogénèse est accompagnée d'une diminution de la croissance, ce qui prouve que la DPA agit sur plusieurs mécanismes.

TABLEAU N° 7

ACTION DE LA DIPHÉNYLAMINE
SUR LA CROISSANCE DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

Concentration en DPA en $\mu\text{g/ml}$	Densité optique $\times 100$ mesurée au bout de									
	15 h.	17 h.	19 h.	21 h.	24 h.	40 h.	43 h.	62 h.	65 h.	72 h.
0	66	77	85	95	103	120				
10	48	62	73	83	93	114				
20	21	33	48	63	79	110				
50	0	0	0	1	4	37	43	50	56	60

D'après GOODWIN et coll. (15) les cultures de *Phycomyces blakesleeanus*, en présence de DPA, voient leur taux de β carotène redevenir sensiblement normal si on ajoute au milieu, de la riboflavine ou de l'acide adénylique du muscle, l'acide adénylique de la levure étant sans action.

Dans le cas de *Rhodospirillum rubrum* par contre, la riboflavine et l'adénosine-5-phosphate sont incapables de ramener la caroténogénèse. Cependant l'action de la DPA n'est pas irréversible car, si après élimination de cet inhibiteur par des lavages, on place la masse bactérienne dans un tampon phosphaté, une pigmentation voisine de la normale peut être obtenue aussi bien en anaérobiose en présence de lumière, qu'en aérobiose dans l'obscurité (18) (30).

Rhodotorula gracilis représente un cas bien différent (55) : si après croissance en présence de DPA, cette levure est lavée puis placée dans un milieu ne contenant ni DPA, ni source azotée, la caroténogénèse reste inhibée alors que la levure normale donne, dans les mêmes conditions, une nette synthèse de caroténoïdes. Si au milieu de culture précédent, on rajoute une source azotée et laisse la levure proliférer, cette dernière recouvre peu à peu sa capacité de synthétiser les pigments : *Rh. rubra* semble se comporter d'une façon identique (64).

Nous avons également tenté pour *Rh. mucilaginosa* de lever l'inhibition de la caroténogénèse provoquée par la DPA.

Une culture ayant poussé sur 20 $\mu\text{g/ml}$ de DPA est lavée quatre fois avec du tampon monopotassique M/15 puis remise en suspension dans ce tampon. Après 20 heures d'aération intense la culture reste blanche ; dans ces conditions la synthèse endogène des pigments n'est donc pas réalisable. L'apport d'une source exogène de carbone sous forme de saccharose ou de glucose n'a pas donné plus de résultat.

Il a fallu, pour obtenir la levée d'inhibition, permettre à la levure de se reproduire par repiquage sur son milieu habituel et même dans ces conditions, la caroténogénèse reste très faible jusqu'au cinquième repiquage environ. Ce fait laisse penser que la DPA reste très fortement fixée sur les cellules. De sorte que nous n'assistons pas à une levée d'inhibition mais à une dilution de l'inhibiteur jusqu'à atteindre la teneur où il devient inactif.

6) Biphényle

L'action de ce composé sur la caroténogénèse de *Rhodotorula mucilaginosa* est intense car pour des concentrations de l'ordre de 20 µg/ml de milieu, on obtient déjà une levure à peine colorée (*) dont la croissance est cependant identique à celle du témoin.

Pour une concentration de 50 µg/ml, la levure obtenue est aussi blanche que celle résultant de l'action de la DPA et ce, pour des concentrations du même ordre de ces deux agents. Le biphényle, dans nos conditions expérimentales, présente de plus l'avantage qu'à concentration égale, la croissance est inchangée, en tous cas beaucoup moins affectée que dans le cas de l'emploi de la diphenylamine (voir tableaux n° 7 et n° 8).

TABLEAU N° 8

ACTION DU BIPHÉNYLE
SUR LA CROISSANCE DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

Concentration du biphényle en µg/ml	Densité optique $\times 100$ mesurée au bout de								
	11 h.	13 h.	14 h.	15 h.	16 h.	18 h.	20 h.	22 h.	24 h.
0	22	30	36	42	50	68	81	90	103
50	13	21	27	35	41	57	72	84	92
100	13	21	26	36	41	59	74	84	93
140	11	18	23	31	36	53	67	78	86
200	11	18	22	30	37	52	67	78	86

(*) A l'encontre des observations de Ark (1), et, malgré de très nombreux isollements et contrôles microscopiques, nous n'avons jamais constaté de modification de notre souche, pouvant laisser supposer que les hydrocarbures ou leurs dérivés employés dans nos expériences, avaient provoqué des mutations.

7) Dérivés du biphényle

Devant ce résultat encourageant, il nous a paru intéressant de chercher si l'activité du biphényle pouvait être encore exaltée par l'introduction de substituants dans la molécule.

Les hydrocarbures s'oxydant dans les milieux biologiques généralement en phénols, nous pouvions penser que le biphényle est lui aussi transformé en dérivés phénoliques par la levure. En ajoutant ces derniers au milieu de culture, nous devons constater une action beaucoup plus marquée que celle de l'hydrocarbure.

D'un autre côté, bien que le mécanisme d'action de la DPA ne soit pas connu, il est probable que la fonction amine n'est pas étrangère au phénomène, aussi avons-nous pensé que les aminobiphényles pouvaient présenter une action supérieure à celle de l'hydrocarbure lui-même.

Nous avons soumis à l'expérimentation les composés suivants provenant de la firme Fluka :

2-hydroxybiphényle, 2-2'-dihydroxybiphényle, 4-hydroxybiphényle, acide diphénique, 4-aminobiphényle, 4-4'-diaminobiphényle et enfin 4-4'-diamino 3-3'-diméthylbiphényle (Tolidine).

Nous avons suivi l'action de ces corps en fonction de la concentration, sur la caroténogénèse et sur la croissance de la levure.

Nos résultats sont résumés dans le tableau n° 9. La pigmentation est exprimée par +++ pour une levure possédant une intensité de pigmentation du même ordre que celle de la souche mère, cultivée dans les mêmes conditions, mais en l'absence d'inhibiteur.

Il en ressort clairement que certains dérivés du biphényle possèdent un pouvoir inhibiteur élevé de la caroténogénèse, dans nos conditions expérimentales. Ce sont : le 2-hydroxybiphényle, le 4-hydroxybiphényle, le 4-aminobiphényle.

D'autres dérivés sont totalement dépourvus d'action sur la pigmentation et certains d'entre eux semblent favoriser très légèrement la croissance de la levure. Ce sont : le 2-2'-dihydroxybiphényle, l'acide diphénique, le 4-4'-diaminobiphényle, la tolidine.

D'après ces résultats, il est possible de voir que parmi les composés du biphényle essayés, tous les dérivés possédant une molécule symétrique sont dépourvus d'action sur les deux phénomènes : croissance et caroténogénèse, alors que tous les dérivés dissymétriques possèdent une puissante action anticaroténogène. Il s'agit peut-être là d'une coïncidence qu'il est prématuré de généraliser.

TABLEAU N° 9
ACTION DES DÉRIVÉS DU BIPHÉNYLE
SUR LA CROISSANCE ET LA CAROTÉNOGÈNESE
DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

<i>Inhibiteur</i>	<i>Concentration en µg/ml</i>	<i>Pigmentation</i>	<i>Densité optique au bout de 24 h.</i>
2-hydroxybiphényle	5	+	105
	10	0	100
	20	0	89
	50	0	67
2-2'-dihydroxybiphényle	20	+++	95
	50	+++	80
	100	++	70
4-hydroxybiphényle	10	0	95
	20	0	62
	50	0	8
	100	0	6
Acide diphénique	50	+++	100
	100	+++	100
	200	+++	100
	400	+++	100
4-aminobiphényle	20	+	100
	50	0	85
	100	0	42
4-4'-diaminobiphényle ...	100	+++	125
	200	+++	125
Tolidine	20	+++	115
	50	+++	115
	100	+++	110
	200	+++	120
	300	+++	120
	500	+++	125
Témoin	—	+++	110

Nous avons tenté de lever l'action inhibitrice du biphenyle et de ses dérivés en mettant à profit l'observation de WEST (61) suivant laquelle, chez le rat, la toxicité du biphenyle est diminuée par addition de méthionine au régime. Bien que cette action soit indirecte, nous avons testé la méthionine et la cystéine à des concentrations allant de 20 à 200 $\mu\text{g/ml}$.

De tous nos essais, seule l'action du 4-aminobiphenyle est abolie par l'addition de cystéine mais non de méthionine au milieu de culture.

L'action des autres dérivés, bien que ne semblant pas pouvoir être supprimée dans le milieu de culture, n'est pas totalement irréversible. Par simple élimination de l'inhibiteur et en l'absence de tout élément nutritif, il est possible en effet de voir réapparaître une caroténogénèse pratiquement normale.

Pour cela, une culture contenant par exemple du 2-hydroxybiphenyle est lavée quatre fois avec une solution de phosphate monopotassique M/15 puis remise en suspension dans un volume de solution phosphatée égal au volume initial de la culture ; l'aération est obtenue par agitation magnétique dans les conditions habituelles. Au bout d'un temps variable, en général entre 10 et 25 minutes, on voit la suspension de levure se colorer en rose, la coloration va en s'accroissant avec le temps jusqu'à atteindre celle d'une culture réalisée dans des conditions normales. Nous avons répété cette expérience de très nombreuses fois, ce qui nous a permis de constater que la réapparition de la pigmentation est un phénomène constant, rapide, mais nécessitant des lavages soigneux.

Ainsi, dans le cas envisagé, la caroténogénèse se fait en dehors de tout apport alimentaire, donc aux dépens de précurseurs accumulés dans les cellules. La nature de ces précurseurs n'est pas exactement établie, mais il faut remarquer que la levure, bien que devenue blanche sous l'action de l'inhibiteur, n'est pas pour autant totalement dépourvue de caroténoïdes ou composés apparentés, tels que certains polyènes incolores. Il n'est pas déraisonnable, à la suite de nombreux auteurs, de considérer ces composés comme étant les précurseurs des caroténoïdes qui apparaissent après la levée d'inhibition.

Nous avons obtenu, à partir de 50 g de levure sèche ayant poussé sur 2-hydroxybiphenyle, une solution jaune très pâle que nous avons chromatographiée. Quatre expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions et ont donné chaque fois des résultats qualitatifs identiques. Nous avons pu en effet mettre en évidence

le ζ carotène, le neurosporène et le phytoène. Le phytoène a été caractérisé par son comportement chromatographique et par son spectre (277-287-298 $m\mu$) dans le cyclohexane (voir FIG. n° 10). D'autre part le mélange avec du phytoène extrait de la tomate selon RABOURN (51) n'a pas pu être résolu par chromatographie.

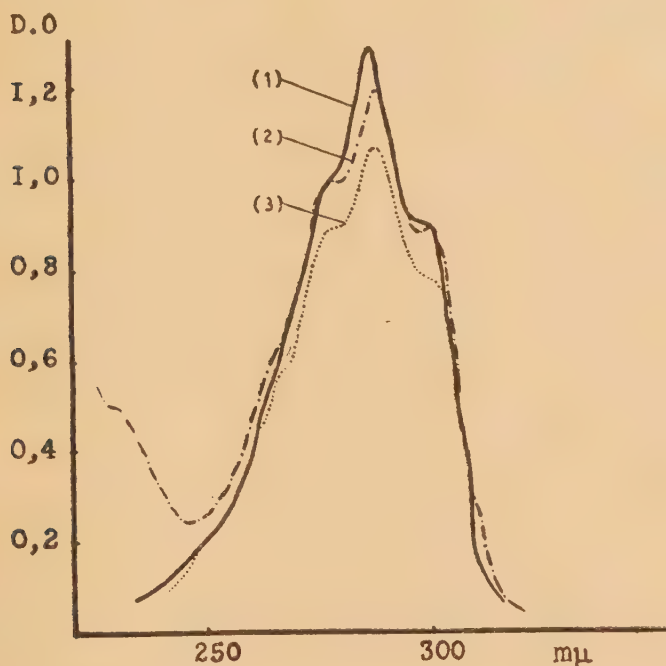


FIG. N° 10
Spectre du phytoène.

1. D'après RABOURN et coll.
2. A partir de RMP cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle.
3. Isolé de la tomate.

Le dosage de ces polyènes a été fait dans deux expériences, en voici le résultat exprimé en $\mu\text{g/g}$ de levure sèche :

Neurosporène	0,84	0,92
ζ carotène	1,66	1,44
Phytoène	6	10

Le phytofluène semble totalement absent de ces cultures.

Pour l'étude cinétique de la réapparition des pigments, nous avons continué à donner la préférence au 2-hydroxybiphényle en raison de son activité anticaroténogène maximum et de sa solubilité relative dans l'eau.

20 ml d'une culture de *Rh. mucilaginosa* sur 2-hydroxybiphényle, âgée de 24 heures, servent à ensemencer 40 boîtes de Roux contenant chacune 200 ml de milieu semi-synthétique gélosé et 40 µg/ml de 2-hydroxybiphényle. La levure est récoltée au bout de 4 jours à l'aide d'une solution à 40 µg/ml de 2-hydroxybiphényle.

Après 4 lavages rapides dans le froid qui éliminent totalement le sucre et le 2-hydroxybiphényle, la masse cellulaire est placée dans 8 l d'une solution de phosphate monopotassique M/15. Nous prélevons alors rapidement un échantillon qui servira au dosage des caroténoïdes à l'instant zéro puis un courant d'air stérile est envoyé dans la suspension. Au bout de 20 minutes, le changement de teinte de la levure est déjà perceptible. Des échantillons sont prélevés au bout de 2 h., 6 h., 12 h., 24 h., 36 h., 48 h., 72 h. ; la levure est tuée par l'acétone et extraite de la manière habituelle. Chaque extrait est chromatographié et les différents caroténoïdes dosés selon les méthodes déjà indiquées. Les résultats d'une de ces expériences sont indiqués dans le tableau n° 10.

III. — RÉSUMÉ

Nous confirmons l'action anticaroténogène de la diphenylamine, action qui ne peut être supprimée que par plusieurs repiquages successifs sur milieu nutritif complet. Nous mettons d'autre part en évidence, pour la première fois, le pouvoir inhibiteur de la caroténogénèse du biphényle et de quelques-uns de ses dérivés. Parmi ces derniers, ceux qui possèdent une molécule dissymétrique semblent seuls doués d'une action inhibitrice comparable à celle du biphényle lui-même.

Enfin, nous avons mis à profit la suppression aisée de l'action du biphényle et de ses dérivés, pour étudier la cinétique de la synthèse de différents caroténoïdes dans les cellules non proliférantes de *Rh. mucilaginosa*.

TABLEAU N° 10

DOSAGE DES DIFFÉRENTS CAROTÉNOÏDES EN FONCTION DU TEMPS,
APRÈS ÉLIMINATION DU 2-HYDROXYBIPHÉNYLE
(Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de levure sèche)

<i>Temps</i>	<i>Torularhodine</i>	<i>Torulène</i>	<i>Neurosporène</i>	γ carotène	ζ carotène	β carotène	<i>Total</i>
0 h.	0	0	0,40	0	3,07	0	3,47
2 h.	0,83	0	0,53	0	5,03	0	6,39
6 h.	2,7	0	0,66	0	8,25	0	11,61
12 h.	21	0	0,72	0	3,12	2,73	27,67
24 h.	58,75	23,30	0,68	13,05	2,48	11,88	113,25
36 h.	70,2	29,6	0,70	15,12	0,68	28,5	145,63
48 h.	72,2	32,1	0,66	7,6	0	32,2	144,76
72 h.	68	8,65	0	7,30	0	15,95	101,02

CHAPITRE IV

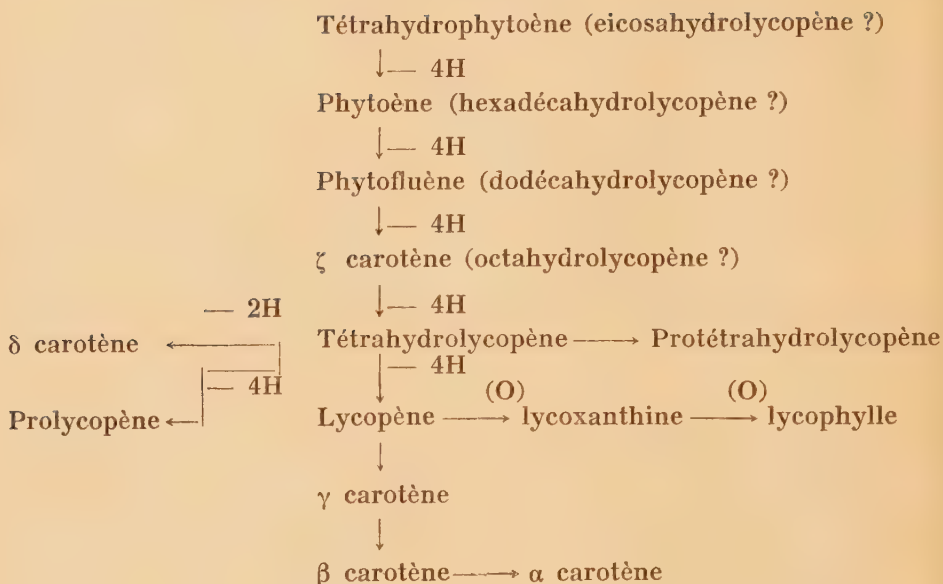
ESSAI D'INTERPRÉTATION DE NOS RÉSULTATS CONCERNANT LA CAROTÉNOGÈNESE

L'étude de BONNER et coll. (4) constitue toujours, à notre connaissance, la seule tentative pour aborder le mécanisme de la caroténogénèse des levures rouges par l'analyse systématique de mutants. Les conditions dans lesquelles ont opéré les auteurs précédents sont très différentes des nôtres ; en particulier les mutants isolés proviennent tous d'une seule irradiation u.v. de la souche mère, alors que la plupart de nos souches sont obtenues après plusieurs irradiations successives, ce qui peut expliquer que nous enregistrons des modifications beaucoup plus marquées.

BONNER et coll. n'ont pas mis en évidence de torularhodine et le torulène constitue dans leur souche mère 70 % des caroténoïdes totaux. Trois de leurs mutants sont restés rouges (IV, VI, VII), deux mutants (I et II) sont orangé et se distinguent de la souche mère par une très forte diminution du torulène et une augmentation du γ carotène sensible, surtout chez le mutant II.

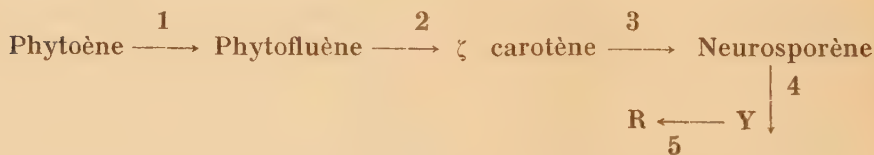
Nous constatons de même chez notre souche RJ1 une disparition pratiquement totale du torulène et une très forte augmentation du γ carotène. Chez RO1, la disparition de la torularhodine est également accompagnée d'une augmentation sensible du β carotène. Il semblerait donc d'après ces résultats que le γ carotène constitue le précurseur du torulène et le β carotène celui de la torularhodine.

De fait, la structure polyisoprénique des caroténoïdes incite à concevoir une filiation dans leur synthèse et c'est ainsi qu'à la suite d'une étude génétique très étendue sur les tomates, PORTER et LINCOLN (49) ont proposé le schéma ci-après : (voir également planche hors-texte)



[D'après GOODWIN (13)]

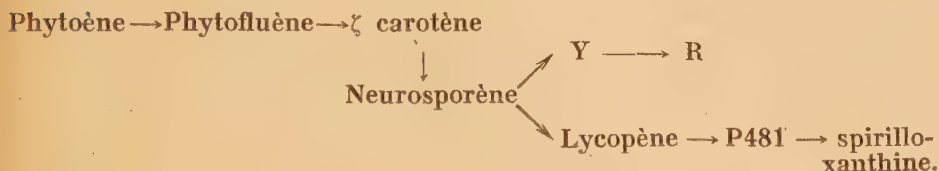
Certains auteurs ont pu mettre en évidence une telle filiation chez les microorganismes, et, récemment, NAKAYAMA (43) a montré à l'aide de mutants de *Rhodospseudomonas* sphéroïdes que deux pigments Y et R se synthétisent selon le schéma :



La réaction 1 serait bloquée chez le mutant bleu-vert qui ne contient plus que du phytoène, la réaction 4 est bloquée chez le mutant vert qui accumule principalement du neurosporène et du dihydroxyneurosporène, alors que la réaction 5 n'a pas lieu chez le mutant brun qui voit s'accumuler du neurosporène et du pigment Y.

Par une étude comparée de l'apparition des caroténoïdes dans des conditions normales et après action de la diphénylamine, JEN-

SEN et coll. (30) concluent également chez *Rhodospirillum rubrum*, à une filiation selon le schéma :



Nous allons envisager si ces schémas peuvent être appliqués aux résultats expérimentaux que nous venons de rapporter, en étudiant les différentes étapes indiquées par les auteurs :

1. — L'existence de la première de ces étapes :

Phytoène $\rightarrow$ phytofluène semble douteuse chez *Rh. mucilaginosa* du fait que ces deux polyènes n'ont pas pu être caractérisés simultanément dans une souche donnée et qu'en particulier, si le phytoène est présent dans notre levure cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle, le phytofluène en est absent.

Si l'on admet avec RABOURN (53) que le phytoène et le phytofluène sont des isomères, la succession de déshydrogénations proposée par PORTER et LINCOLN n'est plus valable et on peut aussi penser que ces deux corps proviennent d'un précurseur commun sans qu'il soit nécessaire que l'un dérive de l'autre.

Il faut cependant se rappeler que KOE et ZECHMEISTER (34) ont apparemment obtenu du phytofluène à partir du phytoène par déshydrogénation à l'aide de N-bromo-succinimide.

2. — L'étape suivante : phytofluène $\rightarrow$ ζ carotène ne semble pas non plus avoir lieu chez *Rh. mucilaginosa*.

D'après l'expérience relatée dans le tableau n° 10 il se synthétise du ζ carotène alors que la levure au départ ne contenait pas de phytofluène qui d'ailleurs n'a jamais pu être caractérisé au cours de cette expérience.

D'autre part, dans les mutants où le ζ carotène a pu être mis en évidence, la présence ou l'absence de phytofluène ne semble pas influencer le taux de ce caroténoïde.

Enfin, d'après les travaux de NASH et coll. (45) le ζ carotène serait un isomère du phytofluène, et non un déshydrophytofluène, ce qui va également à l'encontre de la théorie des déshydrogénations successives.

3. — Le passage du ζ carotène au neurosporène est également douteux chez *Rh. mucilaginosus* car si le neurosporène a pu être caractérisé dans la souche mère en travaillant sur de fortes quantités de levure, le ζ carotène n'y a jamais été mis en évidence. De plus dans la levure cultivée en présence de 2-hydroxybiphényle, le taux de ζ carotène est supérieur à celui du neurosporène, ce qui n'est guère en faveur du passage ζ carotène $\rightarrow$ neurosporène.

4. — La filiation neurosporène $\rightarrow$ lycopène ne semble s'opérer ni chez la souche mère, ni chez les mutants autres que RJPY. Il ne nous a pas été possible en effet, de mettre en évidence le lycopène, même en travaillant sur des quantités de levure sèche de l'ordre de 300 g. De plus dans RJPY où le lycopène représente 86 % des polyènes totaux, le neurosporène représente 4 %, c'est-à-dire un taux semblable à celui des autres mutants où il ne se forme pas de lycopène.

5. — L'enchaînement lycopène $\rightarrow$ γ carotène $\rightarrow$ β carotène semble également peu vraisemblable. En effet, nous n'avons pu déceler de lycopène dans la souche mère qui contient cependant de petites quantités de γ carotène et de β carotène ; d'autre part, après élimination du 2-hydroxybiphényle, le γ carotène apparaît après le β carotène et non avant, de plus la présence de lycopène n'a pu être notée dans ce cas là.

L'apparition de pigments n'existant pas dans la souche mère comme par exemple le lycopène que nous trouvons à un taux élevé dans RJPY est assez difficile à expliquer.

Cependant, on connaît des mutations correspondant à « l'acquisition » d'un gène (63) et d'autres où l'apparition d'un caractère est due à la mutation d'un gène dominant qui exerçait une action inhibitrice.

Quelques cas d'apparition de pigments chez des mutants sont signalés dans la littérature : BONNER et coll. (4) n'ont trouvé de ζ carotène chez *Rh. rubra* que dans le mutant « brun-orangé ». SAPERSTEIN et coll. (54) étudiant les pigments de mutants de *Corynebacterium michiganense* obtenus par action du sulfate d'uranium, signalent dans le mutant orangé, l'apparition de β carotène et de canthaxanthine et, dans le mutant rose, de spirilloxanthine, alors que la souche mère ne contient que de la cryptoxanthine et du lycopène.

Ces résultats laissent penser, qu'au moins chez certains micro-organismes, la synthèse des caroténoïdes ne s'effectue pas suivant la filiation proposée par PORTER et LINCOLN.

Un schéma de filiation ne pouvant rendre compte de nos résultats expérimentaux, nous avons alors pensé que les différents caroténoïdes étaient susceptibles d'être synthétisés indépendamment les uns des autres, à partir d'un précurseur commun. C'est l'idée également soutenue par GOODWIN (18) à la suite de ses travaux concernant l'action de la diphenylamine sur la caroténogénèse de *Phycomyces blakesleeanus*.

Nos résultats expérimentaux peuvent se transcrire dans le schéma ci-dessous, analogue à celui proposé par GOODWIN pour *Phycomyces* :

Précurseur commun	{	Phytoène	}	non inhibés par le 2-hydroxybiphényle
		Phytofluène		
		ζ carotène		
		Neurosporène		
	{	γ carotène	}	inhibés par le 2-hydroxybiphényle
		β carotène		
		Torulène		
		Torularhodine		

Cette théorie proposée par GOODWIN semble parfaitement pouvoir expliquer nos résultats. La présence d'un précurseur commun est confirmée par les données exposées dans le tableau n° 10. En effet, au début de l'expérience, la levure contient 3,47 µg de caroténoïdes par g de levure sèche, au bout de 36 heures d'aération, nous trouvons 145,63 µg par g de levure sèche.

Il n'est guère possible d'identifier le précurseur accumulé, au phytoène, puisque le taux de ce polyène est d'environ 10 µg/g de levure sèche, ce qui est nettement insuffisant pour justifier un tel accroissement de la teneur en caroténoïdes.

La nature de ce précurseur reste à déterminer, mais il pourrait s'agir d'une molécule beaucoup plus petite que l'édifice en C40 proposé dans la théorie de filiation, ainsi que l'a suggéré MACKINNEY (40) pour expliquer l'augmentation considérable de la synthèse du β carotène par *Phycomyces*, sous l'influence de la β ionone.

D'après cet auteur, la partie centrale de la molécule qui est commune à tous les caroténoïdes, se synthétiserait indépendamment des extrémités. Il est intéressant de constater que cette hypothèse rejoint la méthode employée par ISLER et coll. (29) pour effectuer la synthèse des caroténoïdes, en réalisant la condensation de deux fragments symétriques avec un fragment central.

CONCLUSIONS

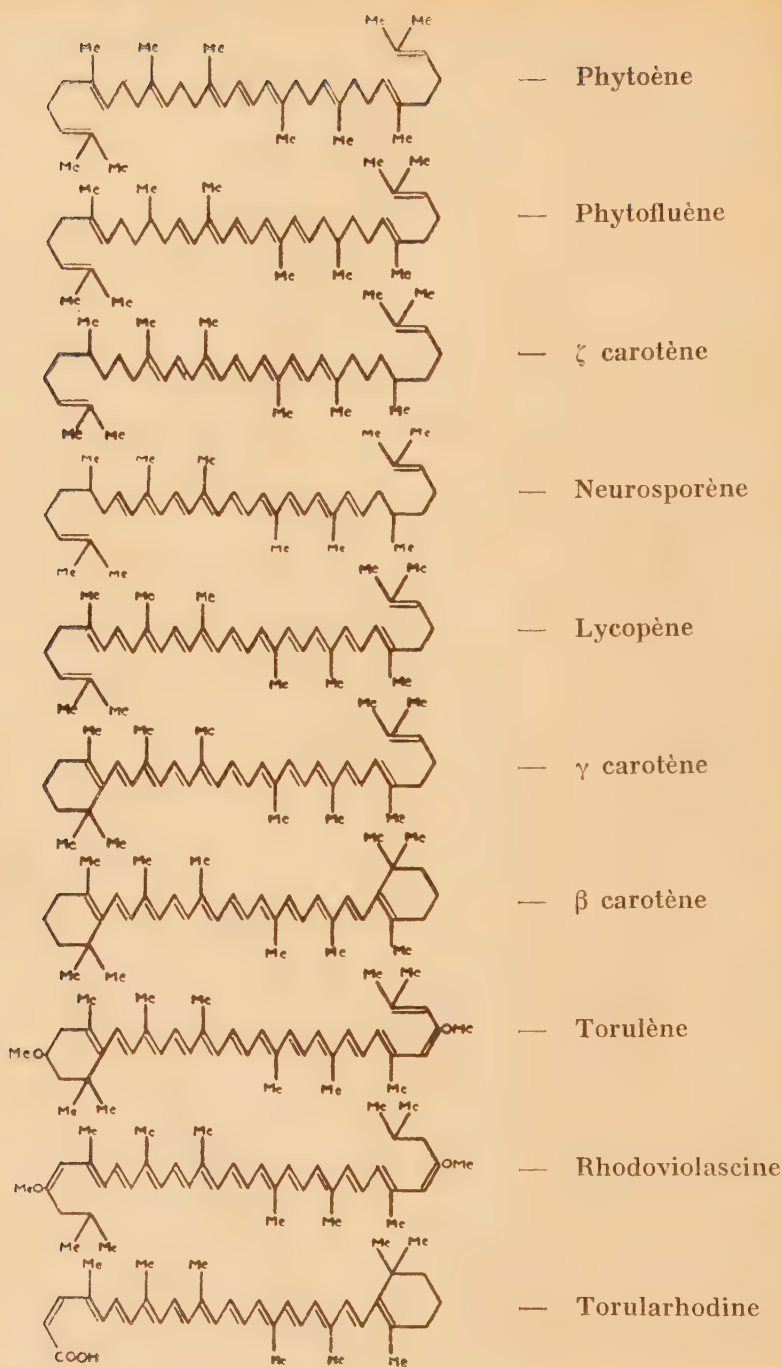
Nous avons tout d'abord étudié la composition en caroténoïdes d'une souche de *Rhodotorula mucilaginosa* que nous avons isolée au laboratoire de Chimie.

Nos résultats montrent la présence de quatre pigments principaux, à savoir : torularhodine, torulène, γ carotène, β carotène. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence de très faibles quantités d'un pigment X jusque-là inconnu chez une levure.

Nous avons pu, ensuite, par des irradiations ultraviolettes successives, modifier dans des proportions considérables, la composition en caroténoïdes de la levure originale, tant au point de vue qualitatif que quantitatif, créant ainsi de nouvelles souches de *Rh. mucilaginosa*. Le mode d'obtention de ces dernières, la stabilité des modifications provoquées et l'apparition de caractères nouveaux, permettent d'affirmer, malgré l'impossibilité d'une analyse génétique, qu'il s'agit bien de mutants. L'analyse des pigments de ces nouvelles souches nous a permis de caractériser un certain nombre de caroténoïdes et polyènes apparentés non encore signalés chez *Rh. mucilaginosa*, ce sont : le neurosporène, le ζ carotène, le phytofluène, le phytoène, le lycopène. De plus, pour la première fois chez une levure, nous mettons en évidence la rhodoviolascine.

La recherche d'un inhibiteur sélectif de la caroténogénèse nous a conduit à la découverte de propriétés remarquables du biphényle et de ses dérivés. Nous avons mis à profit ces propriétés pour étudier la cinétique de la formation de différents caroténoïdes dans les cellules non proliférantes de *Rhodotorula mucilaginosa*.

Enfin, l'analyse de nos résultats expérimentaux nous permet de conclure que, dans notre cas au moins, les différents caroténoïdes se synthétisent par des voies indépendantes.



BIBLIOGRAPHIE

- (1) ARK (P.A.). — *J. Bact.*, 1951, 61, 293.
- (2) BERTOSSI (F.) et CIFERRI (O.). — *Nuovi. Ann. Ig. Microbiol. Ital.*, 1957, 8, 548.
- (3) BODEA (C.), NICOARA (E.), FLORESCU (M.) et GROSS (J.). — *Stud. Cerc. Chim. Roman.*, 1957, 5, 27.
- (4) BONNER (J.), SANDOVAL (A.), TANG (Y.M.) et ZECHMEISTER (L.). — *Arch. Biochem.*, 1946, 10, 113.
- (5) CHAPMAN (A.C.). — *Biochem. J.*, 1916, 10, 548.
- (6) CLAES (H.). — Communication personnelle.
- (7) CLAES (H.). — *Zeit. für Naturforschung.*, 1957, 12, 401.
- (8) CONWAY (E.J.) et BREEN (J.). — *Biochem. J.*, 1945, 39, 368.
- (9) COSTES (Cl.). — *Ann. Agronom. Fr.*, 1958, 9, 35.
- (10) ESCHER (H.H.). — *Helv. Chim. Acta*, 1928, 11, 758.
- (11) FROMAGEOT (Cl.) et TCHANG (J.L.). — *Arch. Mikrobiol.*, 1938, 9, 424.
- (12) GOODWIN (T.W.). — *Biochem. J.*, 1952, 50, 550.
- (13) GOODWIN (T.W.). — *The comparative Biochemistry of the Carotenoids*, Chapman et Hall, Londres, 1952.
- (14) GOODWIN (T.W.) et GRIFFITHS (L.A.). — *Biochem. J.*, 1952, 52, 499.
- (15) GOODWIN (T.W.), JAMIKORN (M.) et WILLMER (J.S.). — *Biochem. J.*, 1953, 53, 531.
- (16) GOODWIN (T.W.) et OSMAN (H.G.). — *Biochem. J.*, 1953, 53, 541.
- (17) GOODWIN (T.W.). — *Experientia*, 1953, 10, 213.
- (18) GOODWIN (T.W.). — *J. of the Science of Food and Agriculture*, 1953, 53, 531.
- (19) GOODWIN (T.W.) et JAMIKORN (M.). — *J. Protozool.*, 1954, 1, 216.
- (20) GOODWIN (T.W.). — *Biochem. J.*, 1956, 62, 348.
- (21) GOODWIN (T.W.), GRIFFITHS (L.A.) et MODI (V.V.). — *Biochem. J.*, 1956, 62, 259.
- (22) GOODWIN (T.W.) et JAMIKORN (M.). — *Biochem. J.*, 1956, 62, 269.
- (23) GOODWIN (T.W.). — *Advances in Enzymology*, 1959, 21, 205.
- (24) GRANGAUD (R.) et GARCIA (I.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1952, 35, 754.
- (25) GRIFFITHS (M.) et STANIER (R.Y.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1956, 14, 698.

- (26) GUIRARD (B.M.), SNELL (E.E.) et WILLIAMS (R.J.). — *Arch. Biochem.*, 1946, 9, 361.
- (27) HAXO (F.). — *Arch. Biochem.*, 1949, 20, 400.
- (28) HÉRISSET (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, 30, 642 ; 1950, 32, 464.
- (29) ISLER (O.) et MONTAVON (M.). — *Chimia*, 1958, 12, 1.
- (30) JENSEN (S.L.), COHEN-BAZIRE (G.), NAKAYAMA (T.O.M.) et STANIER (R.Y.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1958, 29, 477.
- (31) KARASCH (M.S.), CONWAY (E.A.) et BLOOM (W.). — *J. Bact.*, 1936, 32, 533.
- (32) KARRER (P.) et SOLMSSSEN (U.). — *Helv. Chim. Acta*, 1935, 18, 1306 ; 1936, 19, 3.
- (33) KARRER (P.) et RUTSCHMANN (J.). — *Helv. Chim. Acta*, 1943, 26, 2109 ; 1945, 28, 795 ; 1946, 29, 355.
- (34) KOE (B.K.) et ZECHMEISTER (L.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 41, 236.
- (35) KREBS (H.A.). — *Adv. Enzym.*, 1943, 3, 191.
- (36) KUHN (R.) et BROCKMANN (H.). — *Ber.*, 1931, 64, 1349.
- (37) LASKOWSKI (W.) et STEIN (W.). — *Naturwissenschaften, Dtsch.*, 1957, 44, 452.
- (38) LEDERER (E.). — *Thèse doctorat ès Sciences*, Paris, 1938.
- (39) LUTERAAN (P.J.), CHAMPEAU (M.F.) et CHOAY (J.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1947, 141, 616.
- (40) MACKINNEY (G.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 1952, 21, 473.
- (41) MONNIER (P.), HUGUET (R.), GRAS (J.) et JONQUIÈRES (C.). — *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 1958, 18, 88.
- (42) NAKAYAMA (T.O.M.), MACKINNEY (G.), PHAFF (H.J.). — *Antonie van Leeuwenhoek*, 1954, 20, 217.
- (43) NAKAYAMA (T.O.M.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, 75, 356.
- (44) NASH (H.A.), QUACKENBUSCH (F.W.) et PORTER (J.W.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, 3613.
- (45) NASH (H.A.) et ZSCHEILE (F.P.). — *Arch. Biochem.*, 1945, 7, 305.
- (46) PETERSON (W.J.), BELL (T.A.), ETCHELLS (J.L.) et SMART (W.W.G.). — *J. Bact.*, 1954, 67, 708.
- (47) POLGAR (A.) et ZECHMEISTER (L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, 64, 1856.
- (48) POLGAR (A.), VAN NIEL (C.B.) et ZECHMEISTER (L.). — *Arch. Biochem.*, 1944, 5, 243.
- (49) PORTER (J.W.) et LINCOLN (R.E.). — *Arch. Biochem.*, 1950, 27, 390.
- (50) PURCELL (A.E.). — *Anal. Chem.*, 1958, 30, 1049.
- (51) RABOURN (W.J.) et QUACKENBUSCH (F.W.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, 44, 159.
- (52) RABOURN (W.J.), QUACKENBUSCH (F.W.) et PORTER (J.W.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 48, 267.
- (53) RABOURN (W.J.) et QUACKENBUSCH (F.W.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 61, 111.
- (54) SAPERSTEIN (S.), STARR (M.P.) et FILFUS (J.A.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1954, 10, 85.

- (55) SLECHTA (L.), GABRIEL (O.) et HOFFMANN-OSTENHOF (O.). — *Nature*, 1958, 181, 268.
 - (56) SLONIMSKI (P.). — *La formation des enzymes respiratoires chez la Levure*, Masson, éd., 1953, p. 42.
 - (57) STRAIN (H.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, 105, 523.
 - (58) TURIAN (G.). — *Helv. Chim. Acta*, 1950, 33, 1988.
 - (59) TURIAN (G.). — *Helv. Chim. Acta*, 1951, 34, 1060.
 - (60) WARBURG (O.) in UMBREIT (W.W.), BURIS (R.H.) et STAUFFER (J.F.). — *Manometric techniques and tissue metabolism*, Burgess, Publ. Co, Minneapolis, 1949.
 - (61) WEST (H.D.), LAWSON (J.R.), MILLER (I.H.) et MATHURA (G.R.). — *Arch. Biochem.*, 1956, 60, 14.
 - (62) WILLSTÄTTER (R.) et STOLL (A.) in KUHN (R.) et BROCKMANN (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1932, 206, 41.
 - (63) WINGE (Ö) et ROBERTS (C.). — *Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sci. Physiol.*, 1950, 25, 35.
 - (64) WITTMAN (H.). — *Arch. Mikrobiol.*, 1956, 25, 373.
 - (65) ZECHMEISTER (L.) et TUZSON (P.). — *Biochem. J.*, 1938, 32, 1305.
 - (66) ZECHMEISTER (L.). — *Chem. Revs.*, 1944, 34, 267.
 - (67) ZOPF (W.). — *Flora*, 1889, 47, 353.
-

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté :

SYNTHÈSE DES SUCRES AMINÉS LEUR RÔLE BIOLOGIQUE

Vu et approuvé :

Nancy, le 21 novembre 1959.

Le Doyen de la Faculté des Sciences :
E. URION.

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 23 novembre 1959.

Le Recteur de l'Université de Nancy :
G. MAYER.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	11
CHAPITRE PREMIER	
Isolement et caractérisation des caroténoïdes de <i>Rh. mucilaginosa</i>	13
I. — MICROORGANISME EMPLOYÉ	13
II. — MÉTHODES DE CULTURE	14
A) <i>Milieux de culture</i>	14
B) <i>Techniques de culture</i>	15
III. — EXTRACTION ET SÉPARATION DES CAROTÉNOÏDES	16
A) <i>Extraction</i>	16
B) <i>Séparation</i>	17
C) <i>Résultats</i>	19
IV. — DOSAGE DES CAROTÉNOÏDES	25
V. — DISCUSSION ET RÉSUMÉ	27
CHAPITRE II	
Obtention de mutants par irradiation u.v. Analyse de leurs pigments	29
I. — OBTENTION DES MUTANTS	29
A) <i>Technique</i>	29
B) <i>Résultats expérimentaux</i>	30
II. — PRINCIPALES PROPRIÉTÉS DES MUTANTS OBTENUS	33
A) <i>Croissance</i>	33
B) <i>Respiration</i>	34
III. — ANALYSE DES CAROTÉNOÏDES DES SOUCHES MUTANTES	37
IV. — RÉSUMÉ	43
CHAPITRE III	
Influence d'agents chimiques sur la caroténogénèse de <i>Rh. mucilaginosa</i>	45
I. — INTRODUCTION	45
II. — RÉSULTATS	46
1) <i>Phénol</i>	46
2) <i>Phényléthylacétamide</i>	46
3) <i>Hydrocarbures à noyaux condensés</i>	46
4) <i>Streptomycine</i>	48
5) <i>Diphénylamine</i>	48
6) <i>Biphényle</i>	51
7) <i>Dérivés du biphényle</i>	52
III. — RÉSUMÉ	56
CHAPITRE IV	
Essai d'interprétation de nos résultats concernant la caroténogénèse	59
CONCLUSIONS	65
BIBLIOGRAPHIE	67

